Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

# WIRKUNG EINER TOXISCHEN SUBSTANZ AUS VERBRANNTER MÄUSEHAUT AUF DEN KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL IM MUSKEL DES KANINCHENS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

FRANZ BIHR
aus Rodamsdörfle

1980

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

# WIRKUNG EINER TOXISCHEN SUBSTANZ AUS VERBRANNTER MÄUSEHAUT AUF DEN KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL IM MUSKEL DES KANINCHENS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von
FRANZ BIHR
aus Rodamsdörfle

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. H. Heimann |
| Berichterstatter: | Privatdozent Dr. Dr. K. Schmidt<br>( Professor Dr. L. Koslowski )<br>Professor Dr. J. Hausdörfer |

Inhaltsverzeichnis


| | Seite |
|---|---|
| A. Einleitung | |
| 1. Allgemeine Grundlagen | 1 |
| 2. Verbrennungstoxine | 3 |
| 3. Problemstellung und Ausgangspunkt | 6 |
| 4. Kohlenhydratstoffwechsel im Muskel | 13 |
| B. Experimenteller Teil | |
| a. Wahl der Methode | 22 |
| 1. Organentnahme | 22 |
| 2. Narkosemittel | 23 |
| 3. Toxinmenge | 26 |
| b. Material und Methoden | 26 |
| 1. Versuchstiere | 26 |
| 2. Chemikalien | 28 |
| 3. Narkosemittel | 28 |
| 4. Gefrierstoppzange | 29 |
| 5. Isolierung des Verbrennungstoxins aus der Mäusehaut | 29 |
| 6. Versuchsbedingungen | 32 |
| 7. Organentnahme | 33 |
| 8. Obduktion | 35 |
| 9. Mörsern | 36 |
| 10. Bestimmung von Glucose | 36 |
| 11. Bestimmung von Lactat | 37 |
| 12. Bestimmung von Pyruvat | 38 |
| 13. Bestimmung von Fructose-1.6-diphosphat und Dihydroxyacetonphosphat | 38 |
| 14. Bestimmung von ATP | 40 |
| 15. Bestimmung von ADP und AMP | 41 |
| 16. Statistik | 42 |
| C. Ergebnisse | 43 |
| D. Diskussion | 60 |
| E. Zusammenfassung | 70 |
| F. Abkürzungen | 72 |
| G. Literaturverzeichnis | 73 |

# A. Einleitung

## 1. Allgemeine Grundlagen

Bei der Behandlung schwer verbrannter Patienten stehen zwei Probleme im Vordergrund (KOSLOWSKI 1970, SCHOENENBERGER 1976):

1. Die Verhütung oder die Behandlung des Verbrennungsschocks, der schwersten Schockform, die uns klinisch beschäftigt, und
2. die Behandlung der Verbrennungskrankheit. Sie tritt nach Überwindung der Schockphase auf und verläuft trotz aller sehr intensiven personellen und materiellen Anstrengungen meist unter dem Bild einer nicht zu beherrschenden Sepsis, die bei einem (zu) hohen Prozentsatz der Kranken zum letalen Ausgang führt (SCHOENENBERGER 1976).

Eine adäquate Therapie in der Schockphase und ein vermehrtes Wissen um die pathobiochemischen und pathophysiologischen Vorgänge während des Schockzustandes verbesserten die mittlere Überlebenszeit schwerverbrannter Patienten (PHILIPS und COPE 1962). Dagegen ging die Letalität bei drittgradigen Verbrennungen von über 50% der Körperoberfläche nicht wesentlich zurück (KOSLOWSKI 1963, PHILIPS 1968).

Nachdem es gelungen war, den Verbrennungsschock oder Todesfälle durch Frühinfektion zu überwinden, wurde die Verbrennungskrankheit mit den Spättodesfällen zum Hauptproblem. Die Spätphase manifestiert sich in der zweiten und dritten Woche nach dem Trauma durch eine dramatische Wende beim "labormäßig" bereits normalisierten Patienten zu einem septischen Krankheitsbild mit letalem Ausgang (CUENI et al. 1971).

Nachdem grampositive Erreger mit Antibiotika weitgehend beherrscht werden konnten, traten vermehrt Infektionen mit Pseudomonas aeruginosa (Bact. pyocyaneum) auf (KOSLOWSKI 1963). Schwer verbrannte Patienten wurden deshalb mit multivalenter Vaccine (SACHS 1970), monovalenter Pseudomonasvaccine und mit heterologen Pseudomonasantiseren immunisiert und mit menschlichem Hyperimmunplasma behandelt (FELLER und PIERSON 1968, JONES und LOWBARY 1966). Dadurch konnte eine Reduktion der Pseudomonasinfektion erreicht werden. Nach Kontrolle der Pseudomonasinfektion traten etwas häufiger Infektionen mit verschiedenen gramnegativen Bakterien auf, besonders in der Spätphase auch Pilzinfektionen (ALEXANDER et al. 1975).

Die Gesamtletalität von 1967 bis 1970 veränderte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe von 1960 bis 1962 nicht (FELLER und PIERSON 1970). Auch BAXTER (1974) gelangte in einer Studie an über 7600 Patienten zu dem Ergebnis, daß sich die Überlebenschancen für schwerverbrannte Patienten zwischen 1967 und 1971 nicht verbesserten, obwohl - wie KERNAHAN (1967) meint - mit Ausnahme der Krebsforschung auf keinem Gebiet mehr Forschungsarbeit geleistet wurde als auf dem der thermischen Schädigungen.

Die bekannten pathologischen und pathophysiologischen Erscheinungen wie lokale, fokale und allgemeine Infektion, die verminderte Entgiftungsreaktion des reticulohistiocytären Systems, die Herabsetzung der Oberflächenspannung in der Lunge mit Ateminsuffizienz und der Wasser- und der damit verbundene Wärmeverlust durch stark erhöhte Hautdiffusion befriedigen als letzte Ursache für die Spättodesfälle nicht (CUENI et al. 1971).

Da der Vergleich der prozentualen Mortalität mit der Ausdehnung einer Verbrennung dritten Grades in Prozent der Körperoberfläche bei der graphischen Darstellung eine Sigma-Kurve ergibt, wie sie in der Pharmakologie für toxische Substanzen bekannt ist (MOYER und BUTCHER 1967), gewann die Hypothese an Bedeutung, eines oder mehrere Verbrennungstoxine seien am letalen Ausgang beteiligt (SEVITT 1966).

## 2. Verbrennungstoxine

a.) Nach großflächigen Verbrennungen dritten Grades beobachteten BAXTER und Mitarbeiter (1966) klinisch wie auch im Tierexperiment häufig eine Abnahme des Herzminutenvolumens trotz Volumensubstitution. Sie forderten deshalb bei größeren Verbrennungen das Entstehen einer Substanz, welche die Kontraktilität des Herzmuskels verringert (circulating "myocardial depressant factor"). Es bestand eine quantitative Beziehung zwischen der Größe und dem Grad der Verbrennung und dem biologischen Effekt sowohl im Tierversuch als auch beim Patienten (BAXTER et al. 1971). Auch bei Infusion von Plasma verbrannter und verbrühter Tiere nahm beim unverbrannten Empfängertier das Herzminutenvolumen deutlich ab. Dasselbe konnte in Parabioseversuchen gezeigt werden.

b.) ROSENTHAL und Mitarbeiter (1968) isolierten aus bei 90$^{o}$C verbrühter menschlicher Haut eine Substanz, die im Tierversuch toxische und letale Wirkung zeigte. Nach Behandlung mit Ultraschall verlor dieses "rohe Verbrennungstoxin" fast völlig seine letale Wirkung. Es verhinderte bei 90% der Versuchstiere die letale

Wirkung der Verbrennungstoxins: Antitoxin (=Competitin). Aus dem "rohen Verbrennungstoxin" konnte ein toxisches Glykoprotein isoliert werden (ROSENTHAL et al. 1972). Das Antitoxin verhinderte noch bei 50% der Tiere die letale Wirkung des Glykoproteins.

Am Skelettmuskel verringert das toxische Glykoprotein die Verkürzung der Muskelfasern. Am Herzmuskel verursacht es Degenerationen der Mitochondrien und Myofibrillen. ROSENTHAL und Mitarbeiter nehmen an, daß der Herzmuskel Zielorgan des toxischen Glykoproteins ist. Es soll die Adenosintriphosphatase hemmen.

Weiterhin konnte HAKIM (1973) im Serum schwerverbrannter Patienten einen cytotoxischen Faktor nachweisen ("acute burn serum inhibitor"). Dieser cytotoxische Faktor, wie auch das toxische Glykoprotein, behindert die Wanderung normaler Lymphozyten in einer Kammer. Es liegt die Annahme nahe, daß der cytotoxische Faktor sich an die Oberflächen der Lymphozyten anlagert, Rezeptoren, die zum Erkennen von Antigenen nötig sind, besetzt und damit die spezifische zelluläre Abwehr beim schwer verbrannten Patienten verschlechtert.

c.) Mit Hilfe der Gelfiltration untersuchte MOVSHEV (1971) die Eigenschaften der wasserlöslichen Proteinfraktionen normaler und verbrannter Haut. Im Vergleich der Chromatogramme ergab sich kein Unterschied, jedoch war der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen aus verbrannter Haut größer. In weiteren Untersuchungen (FEDOROV et al. 1974) konnte mit Hilfe der präparativen Gelelektrophorese bei 7,5%, nicht jedoch bei 5,5% Gel, eine Proteinfraktion isoliert werden, die als einzige bei der biologischen Testung ausgesprochen toxisch wirkte. Die entsprechende Fraktion konnte in der

normalen Haut nicht nachgewiesen werden.

d.) Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten ALLGÖWER und Mitarbeiter. Sie konnten zeigen (BURRI et al. 1964), daß sterilisiertes Homogenisat normaler Mäusehaut weitgehend atoxisch ist. Dagegen verursacht Homogenisat aus bei 250°C verbrannter Haut einen deutlichen Anstieg der letalität bei RES-blockierten Tieren (BURRI et al. 1964).
Aus dem sterilen Homogenisat verbrannter Mäusehaut konnte ein toxischer Lipoprotein-Komplex isoliert werden (CUENI et al. 1971). Ein analoges, nicht toxisches Kontrollpräparat wurde mit demselben Isolierungsverfahren aus nativer Haut gewonnen (Abb. 4). Der einzige Unterschied zwischen hitzeinduzierter, toxischer Substanz und der nicht toxischen Kontrolle liegt im Auftreten einer hochmolekularen Komponente (Molekulargewicht: 3 - 4 x $10^6$), für welche bei der Polyacrylamid-Elektrophorese die limitierende Porengröße zwischen 5,5 und 6,5% Acrylamid erreicht ist. Diese toxische Komponente scheint ein Polymerisationsprodukt des in normaler Haut vorhandenen Membran-Lipoprotein-Komplexes (Molekulargewicht: 1 x $10^6$) zu sein.
Der Proteinanteil (Apoprotein) des toxischen Lipoproteins ist für die toxische Wirkung verantwortlich. Der Lipidanteil trägt auf unspezifische Weise zur Toxizität bei.
Durch aktive Immunisierung mit dem toxischen Lipoprotein, bzw. passive Immunisierung mit heterologen Antiseren überlebten Versuchstiere eine letale Verbrennung deutlich länger als Kontrolltiere (STÄDTLER et al. 1972).
Aus verbrannter, menschlicher Haut konnte ein weitgehend identischer Lipoprotein-Komplex isoliert werden (SCHOENENBERGER et al. 1974), welcher - unter

Durchbrechung der Speziesbarriere - eine letale Wirkung beim Empfängertier hat. Nach passiver Immunisierung mit humanem Antiserum überlebten 80% der Tiere die letale Verbrennung.

Es wurden weiterhin Untersuchungen durchgeführt (SCHOENENBERGER et al. 1974), um die Frage des kausalen Zusammenhangs zwischen erhöhter Infektbereitschaft und Toxin zu klären. Nach standardisierter Pseudomonasinfektion überlebten von Tieren, die kurz zuvor humanes Verbrennungstoxin erhalten hatten, deutlich weniger als bei der Kontrollgruppe. Heterologes Antiserum, gleichzeitig verabreicht, senkt die prozentuale Sterblichkeit wesentlich. Dies scheint zu beweisen, daß das Verbrennungstoxin die Infektresistenz des Organismus wesentlich vermindert.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von ALLGÖWER und Mitarbeiter haben verschiedene Untersuchungen in unserem Institut gezeigt, daß nicht nur das Lipoprotein aus verbrannter Haut toxisch wirkt, sondern auch das Lipoprotein aus unverbrannter Haut (SCHMIDT 1977).

## 3. Problemstellung und Ausgangspunkt

Die initiale Ödem- oder Schockphase bei einer Verbrennung dauert etwa drei Tage. Anschließend kommt es zur Resorption des Ödems, und der Organismus wird mit toxischen Substanzen, die durch die thermische Schädigung und durch Autolyse entstanden sind, überschwemmt: Intoxikationsphase (Abb. 1). Als Folge davon steigt die Körpertemperatur an (KOSLOWSKI 1959).

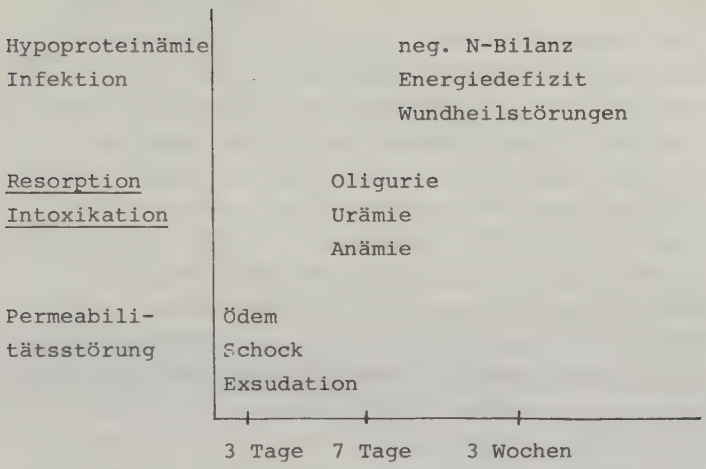



Abb. 1: Phasen der Verbrennungskrankheit (KOSLOWSKI 1970)

Resorbierte Verbrennungstoxine sollen das Herz und die Muskulatur (BAXTER 1971, ROSENTHAL 1972), die körpereigene Abwehr und die Leber schädigen(SCHOENENBERGER et al. 1974, 1976).

Am dritten Tag nach experimenteller Verbrennung findet man bei Versuchstieren eine Schwellung der Leberzellen mit vakuoliger Degeneration, fettiger Metamorphose und fokaler Nekrose. Anschließend kommt es zur Regeneration durch gesteigerte mitotische Aktivität (ARTURSON 1961). Die Degeneration an den Leberzellen soll nicht durch Hypoxie verursacht sein (GILMORE und FOZZARD 1960).

Ähnliche Veränderungen fanden SCHOENENBERGER und Mitarbeiter (1976) nach intraperitonealer Injektion einer toxischen Substanz aus verbrannter Mäusehaut. Lichtmikroskopisch konnt jedoch kein pathologischer Befund erhoben werden. Elektronenmikroskopisch liessen sich Mitochondrienveränderungen nachweisen. Von der Bildung kleiner Vakuolen bis zu vollständigen vakuoligen Umwandlung der Mitochondrien waren alle Übergangsstadien in zunehmendem Maße zu beobachten. Bei fast allen Tieren fiel neben dem Glykogenverlust eine zahlenmäßige Zunahme des Golgi-Komplexes mit Erweiterung der Zysternen auf (SCHOENENBERGER et al. 1976). Es wird angenommen, daß Toxine, die bei der Verbrennung entstehen, auch eine generelle Zellschädigung verursachen und so zum schweren klinischen Bild der Verbrennungskrankheit führen.

Als Ausdruck einer membranschädigenden Wirkung fand DROSTE (1977) nach intravenöser Injektion des Lipoprotein-Komplexes aus verbrannter und unverbrannter Mäusehaut einen Anstieg der β-Glucuronidase, ein Enzym, das vorwiegend in den Lysosomen lokalisiert ist.

Bisher liegen noch keine Untersuchungen vor, wie diese toxischen Substanzen den Stoffwechsel beeinflussen. In dieser Arbeit nun sollen Stoffwechselveränderungen nach Toxingabe im Muskel des Kaninchens untersucht werden. Dabei wurden einige Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels bestimmt. Gleichzeitig untersuchte MEYER (1977) Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels in der Leber.

Wenn nach der Schockphase hauptsächlich die Intoxikation zum Tod des Patienten führt, so liegt die Annahme nahe, daß Verbrennungstoxine neben der Schädigung der körpereigenen Abwehr sicherlich auch einen

veränderten Metabolismus verursachen, der zum Tod des Patienten beiträgt.

Regelmäßig findet man nach Verbrennungen einen gesteigerten Metabolismus. Einige Autoren sind der Ansicht (HARRISON et al. 1964, MOYER 1962, ROE et al. 1964), daß bei der Verbrennungskrankheit nach abgelaufener Schockphase ein direkter Zusammenhang besteht zwischen dem gesteigerten Metabolismus und der Verdunstungskälte. Um die Wärmeneutralität des Körpers zu erhalten, muß der Organismus seinen Metabolismus steigern. Durch Verdunstungskälte wird dem Körper soviel Energie entzogen, daß andere lebenswichtige Aufgaben, wie z.B. Proteinsynthese bei der Wundheilung und Antikörperbildung, reduziert werden.

Zu ganz anderen Ergebnissen gelangten ZAWACKI und Mitarbeiter (1970). Sie schlossen bei einem Teil der Patienten die Verdunstung aus, indem sie die thermisch geschädigten Hautpartien mit einer wasserdichten Kunststoffolie bedeckten. Als Ergebnis fanden sie keinen Unterschied im gesteigerten Stoffwechselumsatz. Beim Auflegen der Kunststoffschicht steigt sogar die Körpertemperatur an, als Zeichen, daß der Körper mehr Wärme produziert, als er abgeben kann.

WILMORE und Mitarbeiter (1974) stellten fest, daß die durchschnittliche Haut- und Kerntemperatur beim verbrannten Patienten 1 - 2$^{o}$C höher war als bei normalen Menschen. Warme Umgebung reduziert den Hypermetabolismus nur gering, in kühler Umgebung vergrössert sich der Hypermetabolismus physiologischerweise. Der Wärmeverlust durch Verdunstung ist nicht der primäre Stimulus für den gesteigerten Metabolismus. Verdunstung von Wasser an der Körperoberfläche ist ein geeigneter Weg, die produzierte Wärme abzugeben (WILMORE et al. 1974, AIKAWA et al. 1975).

Es stellt sich die Frage, ob durch den gesteigerten Metabolismus die Energiereserven des Organismus, in Analogie zum hämorrhagischen Schock (wo dies angenommen wird: SCHUMER und KUKRAL 1968), erschöpft werden. Auch wäre es möglich, daß die Veränderungen im Stoffwechsel teilweise durch Verbrennungstoxine verursacht sind (VAN DE LOO 1976).

Je nach der Schwere des Traumas findet man wochenlang erhöhte Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark (BIRKE et al. 1957, GOODALL et al. 1957). Aber auch nach Anaesthesie und Operationen (RAO und BHATT 1972), beim traumatischen Schock(JÄÄTTELÄ 1972), und beim hämorrhagischen Schock (SHOEMAKER et al. 1961, WATTS und WESTFALL 1964) kommt es zu einer starken Katecholaminausschüttung.

Als Folge davon steigt nach Verbrennungen die Glucose im Blut an (DOLECEK et al. 1971, DOMRES 1977, HINTON 1972). Der Anstieg des Blutzuckers kommt dadurch zustande, daß Adrenalin über das Adenylcyclase-System die Leberphosphorylase aktiviert und so Leberglykogen abbaut. Später fällt dieser erhöhte Glucosespiegel wieder ab, wobei der normale Glucosespiegel beim ausgeprägten Verbrennungsschock regelmäßig unterschritten wird (DOMRES 1977, HINTON 1972). Der Beginn der Hypoglykämie wird als Übergang vom reversiblen zum irreversiblen Schock gedeutet (MIGONE 1962). Nicht lange nach Eintritt der Hypoglykämie tritt der Tod des Organismus ein (DOMRES 1977, HINTON 1972).

Zweitens bewirken Katecholamine eine verstärkte Lipolyse mit Erhöhung der freien Fettsäuren im Blut (BIRKE et al. 1965, ALLISON et al. 1968).

Außerdem verursachen erhöhte Katecholaminspiegel eine verminderte Freisetzung von Insulin aus dem Pankreas (MALAISSE et al. 1967). HINTON und

Mitarbeiter (1971) beobachteten eine Hypoinsulinämie, während DOLECEK (1971) und HESSMANN (1974) normale Insulinwerte trotz erhöhter Glucosewerte fanden.

Schließlich seien noch Veränderungen im Glykogenhaushalt nach Verbrennungen erwähnt (HESSMANN 1974). In der frühen Phase der Verbrennung nimmt das Leberglykogen um ca. 80%, das Muskelglykogen um ca. 60% ab. Adrenalin aus dem Nebennierenmark ist aber nicht unbedingt für den Glykogenabbau im Muskel notwendig; denn nach Entfernen des Nebennierenmarks nimmt der Glykogengehalt im Muskel nach einer Verbrennung ebenso ab (HESSMANN 1975).

Der gesteigerte Metabolismus bei der Verbrennungskrankheit kann durch Blockade der $\alpha$- und $\beta$-Rezeptoren oder der $\beta$-Rezeptoren allein, nicht jedoch durch eine $\alpha$-Rezeptorenblockade verhindert werden (WILMOR et al. 1974).

Bei Patienten mit Verbrennungen von mehr als 40% der Körperoberfläche sind die Adrenalinreserven erschöpft (GOODALL und HAYNES 1960). Bringt man diese Patienten in eine kühle Umgebungstemperatur (21$^{o}$C), so werden sie schnell hypotherm. GOODALL und MONCRIEF (1965) konnten zeigen, daß die Monoaminspeicher in den sympathischen Nervenendigungen und Ganglien nach schweren Verbrennungen leer sind. Gibt man Patienten Dopamin, so findet man eine verstärkte Umwandlung von Dopamin in Adrenalin und Noradrenalin, und der Metabolismus wird weiter gesteigert (GOODALL und ALTON 1969).

Intoxikation und Sepsis aktivieren ebenfalls das sympathische Nervensystem. Bei Patienten mit kleineren Verbrennungen kommt es zu einer Steigerung des Stoffwechsels, bei Patienten mit Verbrennungen von mehr als 40% der Körperoberfläche sind jedoch die Katecholamin-

reserven erschöpft. Bei einer Sepsis oder in der Intoxikationsphase kann der Stoffwechselumsatz nicht mehr gesteigert werden (WILMORE et al. 1973). Der Organismus ist nicht mehr in der Lage, auf dieses zweite Trauma (=Intoxikation) adäquat zu reagieren. Dies wäre eine mögliche Erklärung, weshalb Patienten mit großen Verbrennungen nach Überwindung der Schockphase in der Intoxikationsphase sterben.

Weiterhin findet man nach Verbrennungen wochenlang erhöhte Plasmaspiegel von Glucagon (WILMORE et al. 1973, BATSTONE 1976). Trotz fortwährender Glucoseinfusion und Hyperglykämie (150mg% Glucose) fiel der Plasmaspiegel von Glucagon nicht ab. Noch 30 Tage nach der Verbrennung waren die Werte doppelt so hoch als beim hungernden Tier (WILMORE et al. 1973).

In den ersten drei Wochen nach einer Verbrennung werden im Organismus massiv Proteine abgebaut. Sie werden in der Leber der Gluconeogenese zugeführt. Glucocorticoide stimulieren die Gluconeogenese. Je nach dem Ausmaß der Verbrennung findet man erhöhte Kortisolspiegel (BATSTONE 1976, BIRKE et al. 1957). Es besteht eine positive Korrelation zwischen Kortisol und Alanin, Lactat und allen Substraten der Gluconeogenese (BATSTONE 1976).

In den ersten Wochen nach einer Verbrennung ist der Nüchternplasmaspiegel von Insulin normal oder geringfügig erhöht. Später sind jedoch die Plasmainsulinspiegel trotz leicht erhöhter oder normaler Blutglucosekonzentrationen deutlich erhöht: "Insulinresistenz". Nach Glucoseinfusion kommt es zu einer überschießenden Insulinausschüttung. Wenn die Inselzellen im Pankreas erschöpft sind, kann bei Verbrennungspatienten, die besonders viel Kohlenhydrate zu sich nehmen müssen, ein "Pseudodiabetes" oder

"Stressdiabetes" entstehen (DOLECEK et al. 1969).

BATSTONE und Mitarbeiter (1976) beobachteten bei Patienten mit einer schweren Verbrennung normale Plasmainsulinspiegel trotz erhöhter Blutglucosekonzentration. Es besteht hier ein relativer Insulinmangel, der die Lipolyse begünstigt. Zwischen dem Plasmainsulinspiegel und der freien Fettsäuren, Glycerol und Ketonkörpern besteht eine strenge negative Korrelation.

Es wird deshalb vorgeschlagen (HINTON et al. 1971, JAMES et al.1971), Patienten täglich 200 -600 U Insulin zu geben und genügend Glucose zu infundieren. Der gesteigerte Proteinkatabolismus soll damit reduziert werden.

## 4. Kohlenhydratstoffwechsel im Muskel

Im folgenden wird darauf eingegangen, welche veränderten Metabolitgehalte in der Muskelzelle unter den verschiedenen pathologischen Einflüssen zu erwarten sind

Das für den Aufbau von Glykogen nötige Enzym Glykogensynthetase wird durch Insulin, Glucose, G-6-P und Glucocorticoide gesteigert. Katecholamine und hoher Glykogengehalt verringern die Aktivität der Glykogensynthetase (HERS et al. 1970). Der Abbau des Glykogens erfolgt durch die Phosphorylase via Adenylcyclasesystem. Die Aktivität des Emzyms wird dabei durch Katecholamine gesteigert, durch Insulin gebremst. Dabei sind Glykogensynthese und Glykogenolyse so miteinander gekoppelt,

daß die Aktivität der Phosphorylase zunimmt, wenn die Aktivität der Glykogensynthetase abnimmt und umgekehrt (HIMMS-HAGEN 1967, HERS et al. 1970).

Während die Glucoseaufnahme in die Leber durch Diffusion erfolgt (CAHILL et al. 1959), wird die Glucose in den Muskel unter der Kontrolle von Insulin aufgenommen. Der Glucosetransport wird dabei von zwei Faktoren begrenzt (MORGAN et al. 1961 A):

1. vom Transport durch die Membran
2. durch die Phosphorylierung der aufgenommenen Glucose (Aktivität der Hexokinase).

Bei guter Sauerstoffversorgung, jedoch in Abwesenheit von Insulin, nimmt der Transport durch die Membran ab. Der intrazelluläre Glucosegehalt verringert sich. Gibt man Insulin zu, wird der Glucosetransport gesteigert und die Phosphorylierung wird zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Der intrazelluläre Glucosegehalt nimmt zu (MORGAN et al. 1959, REGEN et al. 1961). Bei Sauerstoffmangel ist der Transport durch die Membran erleichtert (MORGAN et al. 1959, RANDLE und SMITH 1958). Ist genügend Insulin vorhanden, wird die Phosphorylierung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (MORGAN et al. 1961 A). Bei alleinigem Sauerstoffmangel wird die Aktiviät der Hexokinase (MORGAN et al. 1959) und die der Phosphofructokinase (REGEN et al. 1964) gesteigert. Als Folge findet man einen Anstieg der intrazellulären Glucose, von F-1.6-$P_2$ und Lactat, jedoch nur eine geringe ATP-Abnahme (REGEN et al. 1964). Besteht neben dem Sauerstoffmangel im Muskel auch ein Insulinmangel, so bleibt der Glucosetransport durch die Membran der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (MORGAN et al. 1961 A).

Bei einem Blutspiegel von etwa 100 mg% Glucose finden MORGAN und Mitarbeiter (1959) in Gegenwart

von Insulin und Sauerstoff eine Zunahme der intrazellulären Glucosekonzentration, bei gleichzeitigem Sauerstoff- und Insulinmangel jedoch eine Abnahme von Glucose in der Zelle, obwohl dabei der Transport durch die Membran beträchtlich gesteigert wurde. Der Sauerstoffmangel verursacht eine verstärkte Glykolyse durch Aktivierung der Hexokinase und Phosphofructokinase REGEN et al. 1964)

Die Hexokinaseaktiviät, wie auch die Glucokinaseaktiviät in der Leber (SHARMA et al. 1964), ist insulinabhängig (MORGAN et al. 1961 B). So findet man im diabetischen Muskel eine verminderte Hexokinaseaktivität. Die Michaeliskonstante für die durch die Hexokinase katalysierten Reaktion ist 7 mal höher als im normalen Gewebe. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist abgefallen (MORGAN et al. 1961 B). Hohe Konzentrationen von G-6-P verringern ebenfalls die Aktivität der Hexokinase (REGEN et al. 1961). Unter anaeroben Bedingungen jedoch steigt die Aktivität der Hexokinase sowohl im diabetischen als auch beim normalen Muskel stark an (REGEN et al. 1964).

Die Phosphofructokinase (PFK) ist ein wichtiges Schlüsselenzym für die Glykolyse in verschiedenen Geweben (PASSONNEAU und LOWRY 1962). Die PFK-Aktivität kann dabei auf folgende Art und Weise reguliert werden:

Kreatinphosphat hemmt die Aktivität der PFK. Die Hemmwirkung kann durch AMP und anorganisches Phosphat aufgehoben werden (STOREY und HOCHACHKA 1974). Bei der Aktivierung der Glykolyse (bis zum 100-fachen) bei Sauerstoffmangel im Muskel fällt die Kreatinphosphatkonzentration von 30 mM auf 1 mM. In derselben Zeit verändern sich Metabolite, die ebenfalls die PFK regulieren,nur wenig: ATP fällt von 7,2 auf ca. 5,8 mM, die ADP-Konzentration steigt von 2,3 auf 5,0 mM,

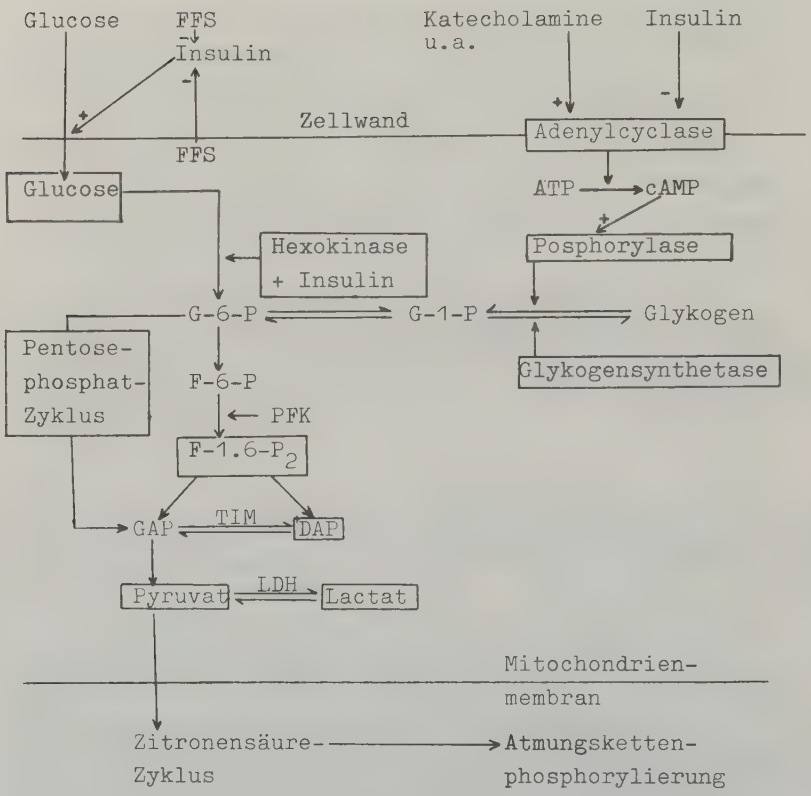



Abb. 2: Kohlenhydratstoffwechsel im Muskel
(stark vereinfacht)
+ bedeutet: wirkt aktivierend
- bedeutet: wirkt hemmend

Weitere Erklärungen im Text.

AMP von 0,4 auf 0,8 mM und Phosphat von 4 auf 8 mM. Wenn man alle anderen Parameter konstant hält, verdoppelt der Kreatinphosphatabfall von 30 auf 1 mM die Aktivität der PFK (STOREY und HOCHACHKA 1974).

ATP hemmt die Aktivität der PFK; ADP, AMP und anorganisches Phosphat stimulieren die PFK (DENTON und RANDLE 1966). Die "energy charge"

$$\frac{ATP + 1/2\ ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

ist dabei für die Aktivität der PFK verantwortlich.

Die Metabolite Fructose-6-phosphat (F-6-P) und Fructose-1.6-diphosphat (F-1.6-$P_2$) steigern ebenfalls die Aktivität der PFK.

Über den Regulationsmechanismus gibt es folgende Modellvorstellung (PASSONNEAU und LOWRY 1962): Am Enzym gibt es eine inhibierende und aktivierende Stelle. Sind beide von ATP besetzt, so ist die PFK gehemmt. Wird jedoch die inhibierende Stelle von anorganischem Phosphat, F-6-P oder F-1.6-$P_2$ besetzt, ist die Aktivität wieder hergestellt.

Citrat, das bei erhöhtem Metabolismus von Fettsäuren, Ketonkörpern und Pyruvat entsteht, vermindert die Aktivität der PFK (NEWSHOLME und RANDLE 1964).

Die PFK ist auch vom pH des Gewebes abhängig. Steigt, z.B. bei einer respiratorischen Alkalose, der pH an, beobachtet man eine Aktivierung der PFK; es kommt zu einer beschleunigten Glykolyse und zu einer Zunahme der Lactatproduktion (COHEN et al. 1975).

Der geringe Anstieg oder Abfall eines einzelnen Metaboliten unter physiologischen Bedingungen verändert die PFK-Aktivität nur gering (RAMAIAH 1976). So steigt nach Adrenalininfusion durch gesteigerte Glykogenolyse die Konzentration von F-6-P stark an, die PFK-Aktivität verändert sich dagegen nur gering.

Die Aktivierung der PFK und damit die Steigerung der Glykolyse kann nur dann erreicht werden, wenn gleichzeitig die Konzentrationen einiger inhibitorischer Metabolite abfallen und/oder die Konzentrationen einiger aktivierender Metabolite ansteigen. Die starke Steigerung der Glykolyse läßt sich dabei nicht durch den additiven Effekt der einzelnen Metabolite erklären. Es kommt zu einem überadditiven Synergismus (RAMAIAH 1976).

| Hemmende Metabolite | Aktivierende Metabolite(1) | Aufhebung der Hemmung von ATP und Citrat (2) |
|---|---|---|
| ATP | $NH_4^+$ | F-1.6-$P_2$ |
| Citrat | Phosphat | 3¦5'-cyclo AMP |
| Kreatinphosph. | 5'-AMP | 5'-AMP |
| 3-P-glycerat | 3¦5'-AMP | ADP |
| P-enolpyruvat | ADP | F-6-P |
| 2-P-glycerat | F-1.6-$P_2$ | Phosphat |
| 2,3-$P_2$-glycerat | $K^+$ | |

Tab. 1: Regulation der Phosphofructokinase (RAMAIAH 1976)

(1) Metabolite, die die PFK aktivieren und bei niedrigen ATP-Konzentrationen auch die Reaktionsgeschwindigkeit der PFK-Reaktion steigern.

(2) Metabolite, die die Hemmung durch ATP aufheben und auch bei hohen ATP-Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit steigern.

Beim Alloxan-Diabetes findet man eine sehr geringe Aktivität der PFK (REGEN et al. 1961, 1964). Durch Rückstau steigt die G-6-P Konzentration an, welche

die Hexokinase noch zusätzlich hemmt. Beim normalen und diabetischen Muskel steigert Sauerstoffmangel die Aktiviät der PFK erheblich. Die F-1.6-$P_2$ und Lactat-Konzentrationen nehmen zu, der intrazelluläre G-6-P Gehalt fällt trotz gesteigerter Glykogenolyse. Der ATP-Gehalt bleibt bei glucosehaltigem Perfusionsmedium fast unverändert; wird jedoch neben Sauerstoff auch Glucose entzogen, so fällt der ATP-Gehalt rasch ab (REGEN et al. 1961, 1964).

Weitere wichtige Intermediärprodukte im Kohlenhydratstoffwechsel sind Pyruvat und Lactat. Bei Anoxie wird die Glykolyse gesteigert, und Pyruvat wird vermehrt in Lactat umgewandelt; dabei wird $NADH_2$ oxidiert, und das entstandene $NAD^+$ steht wieder der Glykolyse zur Verfügung. Lactat wird von der Muskelzelle ins Blut abgegeben und in der Leber der Gluconeogenese zugeführt.

Der Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDH) katalysiert die Umwandlung von Pyruvat, CoA und $NAD^+$ in Acetyl-CoA, $NADH_2$ und $CO_2$. Bei Anstieg des Acetyl-CoA/CoA-, bzw. des $NADH_2/NAD^+$- Quotienten und bei Zunahme der FFS und Ketonkörpern in der Muskelzelle wird die PDH gehemmt (COOPER et al. 1975).

Die PDH-Aktivität ist bei Diabetes mellitus und im Hungerzustand deutlich vermindert. Nach elektrischer Stimulierung des Muskels steigt die PDH-Aktivität deutlich an. Jedoch ist der Anstieg beim hungernden und diabetischen Versuchstier deutlich geringer (HENNIG et al. 1975, HAGG et al. 1976). Die Hemmung der PDH beim Diebetes mellitus ist durch den Anstieg des Acetyl-CoA, von $NADH_2$, FFS und Ketonkörpern in der Zelle bedingt (SCHULZE und KAFFARNIK 1970).

Die PDH wird durch den Abfall von ATP und Kreatinphosphat und durch den Anstieg von Lactat aktiviert (HAGG et al. 1976, HENNIG et al. 1975).

Die Citratsynthetase in den Mitochondrien katalysiert die Reaktion: Acetyl-CoA+Oxalacetat→Citrat+CoA. Unter dem Einfluß von CoenzymA-Thioester, die als Intermediärprodukte bei der β-Oxidation entstehen, kommt es zu einer Verringerung der Affinität der Citratsynthetase gegenüber Oxalacetat. Dabei ist die Länge des aliphatischen Anteils des CoenzymA-Esters von wesentlichem Einfluß, indem der Hemmeffekt mit der Verkürzung der Fettsäurenketten immer schwächer wird. Auch hemmen langkettige CoenzymA-Thioester die Acetyl-CoA-Carboxylase, und die Fettsäurensynthese ist damit reduziert (WIELAND und WEISS 1965, TUBBS 1963).

Die Muskelzelle hat verschiedene Möglichkeiten der ATP-Bildung. Unter aeroben Bedingungen werden Glucose und Fettsäuren bis zu Acetyl-CoA abgebaut, in den Citratcyclus eingeschleust und ATP entsteht in der Atmungskettenphosphorylierung aus ADP.
Unter anaeroben Bedingungen entsteht aus Kreatinphosphat mit Hilfe der ATP-Kreatin-Transphosphorylase (Kreatinkinase) ATP aus ADP. Ebenfalls können in der durch die Adenylatkinase (Myokinase) katalysierten Reaktion aus 2 ADP-Molekülen ATP und AMP entstehen. Eine dritte Möglichkeit der ATP-Bildung unter anaeroben Bedingungen besteht in einer gesteigerten Glykolyse, wobei Lactat entsteht.

Bei fehlender Atmungskettenphosphorylierung unter anaeroben Bedingungen soll es zu einer raschen Abnahme von ATP im Muskel kommen. Dabei wird vermehrt anorganisches Phosphat in das Blut abegegeben (SCHUMER und KUKRAL 1968).

Trotzdem gibt es Untersuchungen (REGEN et al. 1964), die zeigen, daß ein Sauerstoffmangel recht lange kompensiert werden kann und ATP nicht sofort abfällt. Es ist aber dabei nötig, daß der Muskulatur genügend Glucose angeboten wird. Es kommt zu einer beschleunigten Glucoseaufnahme in die Zelle und zu einer gesteigerten Glykolyse. Die F-1.6-$P_2$ und Lactat-Konzentrationen steigen an, ATP hingegen zeigt nur einen geringen Abfall.

## B. Experimenteller Teil

### a. Wahl der Methode

#### 1. Organentnahme

Unter einem Metaboliten eines Gewebes versteht man den Gehalt einer Komponente der normalen Sequenz einer Stoffwechselreaktion (WELCH 1945).
Von einem "Metabolitgehalt" soll dann gesprochen werden, wenn der Analysenwert auf das Frischgewicht des betreffenden Gewebes bezogen wird (HOHORST 1950). Dabei bleibt die Verteilung auf verschiedene Zelltypen, auf Blutgefäße und den interstitiellen Raum unberücksichtigt.

Die geeignetste Methode zur Fixierung des Augenblickzustandes lebender Zellen und Gewebe ist ihre rasche Abkühlung auf tiefe Temperaturen (WOLLENBERGER et al. 1960). Dabei ist die Wärmeleitfähigkeit des kühlenden Mediums von entscheidender Bedeutung. Bei Verwendung von flüssigem Stickstoff oder flüssiger Luft sind die Wärmeaustauschbedingungen besonders ungünstig, weil diese Flüssigkeiten beim Erwärmen verdampfen, wobei sich um das abzukühlende Objekt eine wärmeisolierende Gashülle bildet.
Eine einfache Methode, Gewebe einzufrieren, besteht darin, daß das Gewebe zwischen zwei tiefgekühlten, schnell aufeinanderstoßenden Blöcken eines gut wärmeleitenden Metalls zu einer dünnen Schicht zusammengepreßt wird. Die für den Wärmeaustausch günstige Geometrie des flachgepreßten Gewebes gestattet die Abkühlung größerer Proben.

Als empfindlicher Indikator für die Fixierung des "Status in vivo" haben sich die Relationen Lactat/Pyruvat und ATP/ADP erwiesen. So nimmt der

ATP/ADP-Quotient in der Leber in den ersten 10 Sekunden nach der Organentnahme um ca. 50% ab, in den folgenden 50 Sekunden dann nur noch um ca. 10% des Ausgangswertes (HOHORST et al. 1950).

In unseren Versuchen wurde deshalb eine Gefrierstoppzange (Größe der Metallblöcke: 6x3x0.7 cm) verwendet, um zwei Muskelproben und zwei Stücke aus der Leber (MEYER 1977) zu entnehmen.

## 2. Narkosemittel

Von MARQUEZ-JULIO und FRENCH (1967) wurde mit der Gefrierstoppzange untersucht, welchen Einfluß Äther, Pentobarbital und Ausschluß von Narkosemittel bei der Organentnahme auf die Analysewerte ausüben. Die besten Ergebnisse erhalten die Autoren bei Verwendung von Pentobarbital: die höchsten ATP- und die niedrigsten Lactatkonzentrationen. Deshalb wurde auch bei dieser Arbeit Pentobarbital als Narkosemittel angewandt.

Da bei unseren Versuchsbedingungen eine lange Narkose (4 Stunden) notwendig war, darf man annehmen, daß das Narkosemittel bei allen Versuchen die Stoffwechselvorgänge deutlich beeinflußt hat. Deshalb soll hier kurz die Wirkung von Pentobarbital auf den Organismus diskutiert werden:

Arterielle Blutzuckerwerte und der basale Insulinspiegel waren bei hungernden Tieren unter Pentobarbitalnarkose von 5 Stunden leicht erhöht im Vergleich zu Tieren mit 15 Minuten langer Narkose(BAILEY et al. 1975). Nach intravenöser Glucoseinfusion beobachtete man höhere arterielle Blutzuckerwerte und einen geringeren Plasmainsulinspiegel. BAILEY und Mitarbeiter

(1975) fanden, daß nach längerer Pentobarbitalnarkose der Insulinmetabolismus gesteigert ist, obwohl der basale Plasmainsulinspiegel und der arterielle Blutzuckergehalt weitgehend in der Norm liegen.

Auch in verschiedenen anderen Arbeiten wurden erhöhte Glucosewerte nach intravenöser Glucoseinfusion bei Pentobarbitalnarkose beobachtet (RENAULD und SVERDLIK 1975, AYNSLEY-GREEN et al. 1973, FURNER et al. 1972). Die Effekte sind dosisabhängig.

DAVIDSON (1971) konnte zeigen, daß in Gegenwart von Pentobarbital die Glucoseaufnahme in den Muskeln reduziert war. Die Effekte der Pentobarbitalnarkose entstehen also durch Veränderung des Glucosemetabolismus in Leber und Peripherie.
Bei gefütterten Tieren fanden AYNSLEY-GREEN und Mitarbeiter (1973) erniedrigte Insulinwerte, die durch Hemmung der Insulinsekretion bei gesteigerter Aktivität des Sympathikus bedingt sein soll.

Bei der mitochondrialen Wasserstoff- und Elektronenübertragung hemmt Pentobarbital die an $NADH_2$ gebundenen Oxidationen der Atmungskette:
$NADH_2 + FAD \longrightarrow NAD^+ + FADH_2$. Die Atmungskettenphosphorylierung ist jedoch nicht entkoppelt (SCHOLZ et al. 1966). Der Sauerstoffverbrauch der Zelle nimmt ab. Bei einer Pentobarbitalkonzentration von 0.37 mM/l ist die Zellatmung um 30% gehemmt. Diese Atmungsdepression ist voll reversibel.

Unmittelbar nach Einwirken des Pentobarbitals setzt eine starke Glykolyse ein, die zur Ausschüttung von Lactat führt. Die Glykolyserate ist dosisabhängig.

Ein wertvolles Indikatorsystem für die extramitochondrialen Redoxpotentiale ist das Redoxpaar Lactat/Pyruvat, das wegen der ausschließlichen Lokalisation

der LDH im extramitochondrialen Raum eine sichere Aussage über das dort herrschende Redoxpotential des NAD-Systems zuläßt. Der Lactat/Pyruvat-Quotient ist nach Einwirken von Pentobarbital stark erhöht und bei Überdosierung des Narkosemittels findet man einen Lactat/Pyruvat-Quotienten von ca. 30, der sich von Messungen unter Anoxie nicht wesentlich unterscheidet (SCHOLZ et al. 1966).

Wenn man voraussetzt, daß die Metabolite Lactat, Pyruvat und ATP bei der Ratte bedingt vergleichbar sind mit denen beim Kaninchen, so findet man bei dieser Arbeit stark erhöhte Werte von Lactat und Pyruvat bei den Kontrolltieren (Tab. 2). Dies ist sicher zum Teil auf die lange Pentobarbitalnarkose ( 4 Stunden ) zurückzuführen.

Metabolitgehalte im Muskel:

| | Ratte (1) | Ratte (2) | Kaninchen (3) |
|---|---|---|---|
| ATP | 7.25 | 5.15 | 5.88 |
| ADP | 0.48 | | 0.90 |
| ATP/ADP | 15.40 | | 6.50 |
| Lactat | 1.44 | 2.45 | 5.86 |
| Pyruvat | 0.08 | 0.10 | 0.32 |
| L/P | 18.0 | 28.5 | 19.4 |

Tab. 2: Vergleich verschiedener Metabolite der Ratte mit den Werten beim Kaninchen
(1) MARQUEZ-JULIO und FRENCH 1967
(2) VAN DE LOO 1976
(3) Metabolitgehalte beim Kaninchen in dieser Arbeit (Kontrolltiere)

3. Toxinmenge

MASKOS und DROSTE(1977) konnten in Vorversuchen zeigen, daß bei 3 bzw. 4 mg Apoprotein aus der verbrannten Haut /kg Körpergewicht (SCHOENENBERGER et al. 1972) alle Versuchstiere eine Stunde nicht überlebten. Bei derselben Dosierung des nativen Apoproteins starben die Hälfte der Versuchstiere.
Das Protein aus verbrannter Haut wurde deshalb in einer Dosierung von 2 mg/kg KG intravenös injiziert. In dieser Arbeit wurden insgesamt 45 Kaninchen untersucht. Bei 38 konnten Organe entnommen werden; 7 Tiere starben:

1 Tier sofort nach Injektion des Proteins aus verbrannter Haut
1 Tier sofort nach Injektion des Proteins aus unverbrannter Haut
1 Tier 1 - 4 Stunden nach Injektion des Proteins aus verbrannter Haut
4 Tiere 1 - 4 Stunden nach Injektion des Proteins aus unverbrannter Haut.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß nicht nur das Apoprotein aus verbrannter Haut, sondern auch das Apoprotein aus unverbrannter Haut im Organismus toxisch wirkt.

b. Material und Methoden

1. Versuchstiere

A. Als Versuchstiere für die Gewinnung der Haut, aus welcher der Lipoprotein-Komplex isoliert wurde (SCHOENENBERGER et al. 1972), dienten NMRI-Mäuse von der Versuchstierfarm Willi Gassner, 8741 Sulzfeld. Alle Tiere erhielten das Trockenfutter Altromin und Wasser ad libitum.

B. Als Versuchstiere für die Tierversuche dienten männliche und weibliche Kaninchen mit einem Durchschnittsgewcht von 3.1 kg von der Versuchstierfarm Schmid, Holzgerlingen. Sie erhielten ebenfalls das Trockenfutter Altromin und Wasser ad libitum. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten. Die Raumtemperatur betrug 18 - 22°C.

Die Tiere wurden in folgende Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: 6 Tiere, i.v. Injektion von 2 ml 0.9% NaCl; Organentnahme nach 4 Stunden: Kontrollgruppe.

Gruppe 2: 6 Tiere, i.v. Injektion von 2 mg Nativ-Protein/kg KG gelöst in 2 ml Tyrode I/II (aus unverbrannter Haut); Organentnahme nach 4 Stunden.

Gruppe 3: 6 Tiere, i.v. Injektion von 2 mg Protein aus verbrannter Haut (Toxin)/kg KG, in 2 ml Tyrode I/II gelöst; Organentnahme nach 4 Stunden.

Gruppe 4: 10 Tiere, i.v. Injektion von 2 mg Nativ-Protein/kg KG, gelöst in 2 ml Tyrode I/II; Organentnahme nach 24 Stunden.

Gruppe 5: 10 Tiere, i.v. Injektion von 2 mg Protein aus verbrannter Haut(Toxin)/kg KG, gelöst in 2 ml Tyrode I/II; Organentnahme nach 24 Stunden.

Um Stoffwechselschwankungen, die vom Tag- und Nachtrhythmus abhängig sind (PESSACQ et al. 1972), weitgehend auszuschalten, wurden die Organe in den meisten Fällen zwischen 13 und 16 Uhr entnommen.

2. Chemikalien

a.) für die Isolierung des Verbrennungstoxins: Metallfreies, doppelt destilliertes Wasser wurde verwendet. Alle Chemikalien waren analysenrein. Die während der Isolierung verwendeten Elektrolytlösungen hatten die Zusammensetzung von deproteiniertem Serum: zwei sterile Stammlösungen, Tyrode I und Tyrode II wurden zu gleichen Teilen gemischt und das pH mit 2 N NaOH auf pH 8.6 eingestellt (Tyrode I: 0.274 M $Na^+$, 0.054 M $K^+$, 0.0072 M $Ca^{2+}$, 0.004 M $Mg^{2+}$, 0.285 M $Cl^-$, pH 6.1; Tyrode II: 0.0245 M $Na^+$, 0.0238 M $HCO_3^-$, 0.00065 M $H_2PO_4^{2-}$, pH 8.1).

b.) für die enzymatische Analyse der Gewebsproben: Alle Reagentien für die enzymatische Messung stammten von der Fa. Böhringer, Mannheim.
Glucose: Biochemica Test Combination Nr. 124010
Pyruvat: Biochemica Test Combination Nr. 124982
Lactat: Biochemica Test Combination Nr. 124842
ATP: Biochemica Test Combination Nr. 123897
ADP/AMP: Biochemica Test Combination Nr. 15980
Triosephosphat-Isomerase aus Skelettmuskel kristallisiert, Suspension in 3.2 M Ammoniumsulfat-Lösung, $\geq$ 5000 U/mg, Bestellnr. 15333
Aldolase aus Skelettmuskel kristallisiert, Suspension in 3.2 M Ammoniumsulfat-Lösung $\geq$ 9 U/mg (25°C), Bestellnr. 15419
NADH: $\beta$-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, red. Form als Dinatriumsalz, Bestellnr. 15142

3. Narkosemittel: Nembutal$^R$ (Pentobarbital-Natrium), Deutsche Abbott GmbH, 6507 Ingelheim am Rhein.

4. Gefrierstoppzange

Als Gefrierstoppzange wurde eine Zange verwendet, bei der Metallblöcke (6x3x0.7 cm) als Backen mit gut aufeinander passenden Innenflächen eingebaut waren.

5. Isolierung des Verbrennungstoxins aus Mäusehaut: (SCHOENENBERGER et al. 1972, SCHMIDT 1977)

Die Mäusehaut wurde für das Isolierungsverfahren folgendermaßen präpariert:
Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, rasiert, die Haut abgezogen und das subkutane Fett mit Pinzette und Skalpell entfernt. Zur Hitzeapplikation wurde ein elektrisch geheizter, thermostatisch auf 250°C eingestellter Kupferstempel während 15 Sekunden auf die Hautstücke gepreßt (Abb. 3).

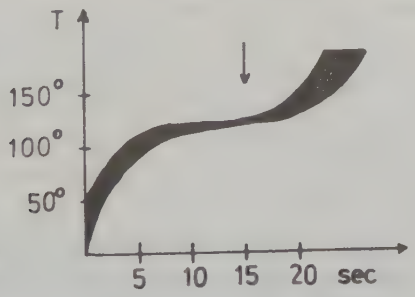



Abb. 3: Temperaturprofil in der Mäusehaut bei Einwirkung von 250°C unter konstantem Druck.

Nicht erhitzte, sonst gleich behandelte Haut diente für Parallelversuche. Die nativen und die verbrannten Hautstücke wurden in Aluminiumfolie gepackt, schnell eingefroren und im Kühlraum langsam aufgetaut.
Isolierung (Abb. 4): Die Hautstücke wurden in kleine

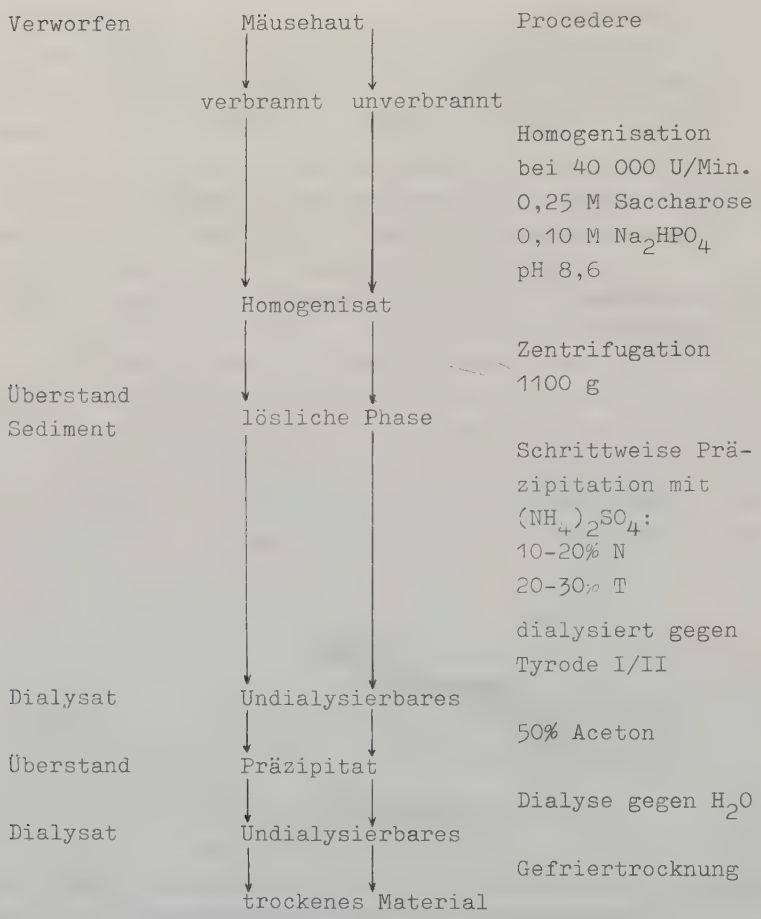



Abb. 4: Schema des Isolierungsverfahrens zur Gewinnung des Lipoproteinkomplexes aus verbrannter und unverbrannter Haut (N=Nativ, T=Toxin) (SCHOENENBERGER et al. 1972).

Stücke geschnitten und in eine Lösung von 0.25 M Saccharose und 0.1 M $Na_2HPO_4$ mit pH 8.6 gegeben. Während 10 Minuten wurde mit 40 000 Umdrehungen/Min. homogenisiert. Beim Zentrifugieren (1100 g, 20 Min.) bildeten sich aus dem Homogenisat drei Fraktionen. Überstand und Sediment wurden verworfen. Die mittlere Fraktion wurde gegen Tyrode I/II dialysiert. Nach Korrektur auf pH 8.6 wurde mit Ammonuimsulfat stufenweise präcipitiert. Die bei der Salzsättigung zwischen 20 und 30% ausfallende Fraktion (10-20% bei nativer Haut) wurde erneut gegen Tyrode I/II dialysiert, bis kein Ammoniak mit Nesslers Reagenz mehr nachweisbar war. Mit 50% Aceton wurde erneut präcipitiert und das nicht dialysierbare Material wurde gefriergetrocknet.

Diese isolierten Substanzen aus verbrannter und unverbrannter Haut sind Lipoprotein-Komplexe mit ähnlicher chemischer Zusammensetzung und ähnlichen physikalischen Eigenschaften. Das Verhältnis von Lipid und Protein ist in beiden Fraktionen gleich. Der Lipidanteil enthält sechs verschiedene Lipidklassen sowohl bei verbrannter als auch bei unverbrannter Haut. Ebenfalls besteht bei beiden Produkten eine Übereinstimmung im Proteinanteil, der jeweils aus sechs verschiedenen Polypeptidketten besteht. Das Produkt aus verbrannter Haut besitzt eine höhere Dichte und ein höheres Molekulargewicht. Es liegt die Annahme nahe, daß das Toxin aus einem Lipoprotein-Komplex der Haut (MG: $1x10^6$) durch Polymerisation entsteht (MG: ca. $3-4x10^6$) (SCHOENENBERGER 1975).

Lipidextraktion: Der Lipidanteil der aus verbrannter und unverbrannter Haut gewonnenen Lipoprotein-Komplexe wurde 1. mit Äthanol (1:20 w/v)
2. mit Äthanol-Diäthyläther (3:2 v/v) und
3. mit Methanol-Chloroform (2:1 v/v) extrahiert.

Die organischen Lösungsmittel wurden mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend verdampft. Der Rückstand wurde gewogen und bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Bei unseren Tierversuchen wurde also nur das Apoprotein des Lipoprotein-Komplexes verwendet.

Für jedes Versuchstier wurde 2 mg Apoprotein/kg KG abgewogen, in 2 ml Tyrode I/II gegeben und unter Kühlung homogenisiert. Die Lösung wurde den Tieren langsam in die Ohrvene injiziert. Kontrolltiere erhielten 2 ml 0.9% NaCl.

6. Versuchsbedingungen

Die laterale Ohrvene wurde mit einer Butterfly punktiert. Dann wurden die Tiere mit Nembutal® (Pentobarbital Natrium 50 mg/ml) narkotisiert. Eine erste Injektion von 0.5 ml/kg KG und nach 10 Minuten eine weitere Injektion von 0.5 ml/kg KG genügten, um die Tiere in die notwendige Narkosetiefe zu versetzen. Darauf wurden die A. und V. femoralis am linken Bein freigelegt und in die beiden Gefäße wurden Katheter eingeführt, um den zentralen arteriellen und venösen Blutdruck zu messen (MASKOS, DROSTE 1977). Dann wurde durch die Ohrvene das Toxin, bzw. Nativ-Protein, bei der Kontrollgruppe 2 ml 0.9% NaCl injiziert. Von MASKOS wurden verschiedene Parameter des kardiovaskulären Systems (arterieller Druck, zentraler Venendruck, EKG, usw.), von DROSTE verschiedene Parameter im Serum (β-Glucuronidase, Cholinesterase, Glucose, Lactat und Elektrolyte) gemessen. 90 Minuten nach Toxingabe waren die Messungen abgeschlossen, und durch geringe Mengen Nembutal® wurden die Kaninchen in leichter Narkose gehalten. 4 Stunden nach Toxingabe wurde sukzessiv soviel Nembutal® injiziert, daß die Tiere gut narkotisiert

waren. Kaninchen, bei denen nach 24 Stunden die Organe (Muskel, Leber) entnommen werden sollten, wurden tags zuvor 2 mg Apoprotein/kg KG injiziert. 20 Stunden nach Toxingabe wurden diese Tiere ebenfalls narkotisiert, um etwa gleiche Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Kurz vor Organentnahme wurde die Narkose verstärkt, um dem Tier bei Schmerzfreiheit die Organe entnehmen zu können.
Während der ganzen Narkose wurde die Körpertemperatur der Kaninchen überprüft. Fiel sie unter 37°C ab, so wurden die Tiere mit einer Rotlichtlampe erwärmt.

7. Organentnahme

Am rechten Bein wurde knapp unterhalb des Knies ein Radiärschnitt gemacht. Darauf wurde am medialen Oberschenkel nach proximal bis zum Lig. inguinale das Fell eingeschnitten. Sorgfältig wurde dabei darauf geachtet, keine großen Gefäße anzuschneiden, um den Blutverlust so gering wie möglich zu halten. Das Fell wurde nach proximal am Oberschenkel stumpf abpräpariert. Zwei Muskel wurden am Oberschenkel freipräpariert. Jetzt wurde die Gefrierstoppzange im flüssigen Stickstoff abgekühlt. Dann wurde der Muskel distal mit einer Klemme festgehalten, die distale Sehne abgeschnitten, sodaß die Blutversorgung des Muskels noch gewährleistet war. Zwischen den beiden Backen der Gefrierstoppzange wurde der Muskel sofort tiefgefroren. Am proximalen Ende wurde der Muskel knapp hinter der Gefrierstoppzange abgeschnitten. Sofort wurde das Muskelstück zusammen mit der Gefrierstoppzange in flüssigen Stickstoff eingebracht. Anschließend wurde die Probe in einen mit Löcher versehenen Urinbecher gegeben und in einem Dewar-Gefäß in flüssigen Stickstoff getaucht. Mit dem zweiten Muskelstück wurde ebenso verfahren.

Anschließend wurde das Abdomen eröffnet und mit

derselben Methode wurden Gewebsproben von der Leber entnommen (MEYER 1977). Die Operation dauerte 15 Minuten:

1. Freipräparieren von 2 Muskel am Oberschenkel 6 Min.
2. Einfrieren der zwei Muskelstücke in vivo und Einbringen in flüssigen Stickstoff 3 Min.
3. Eröffnen des Abdomens 3 Min.
4. Einfrieren von Gewebsproben aus der Leber und Einbringen in flüssigen Stickstoff 3 Min.

Abb. 5: Kaninchen auf dem Operationstisch

8. Obduktion

Bei allen Tieren, bei denen nach 24 Stunden Organe entnommen wurden, wurden nach dem Töten des Tieres mit 10%

KCl Herz und Lungengefäße auf Thromben untersucht. Bei 70% der Tiere, denen 2 mg Apoprotein aus verbrannter Haut injiziert wurde, fand man makroskopisch wandständige Thromben im rechten Vorhof und in der rechten Kammer, selten jedoch eine Lungenembolie (Abb. 6). Bei 50% der Tiere, denen 2 mg Apoprotein aus unverbrannter Haut injiziert wurde, fand man makroskopisch Lungenembolien, selten jedoch randständige Thromben im rechten Vorhof und in der Kammer (10%) (Abb. 7).

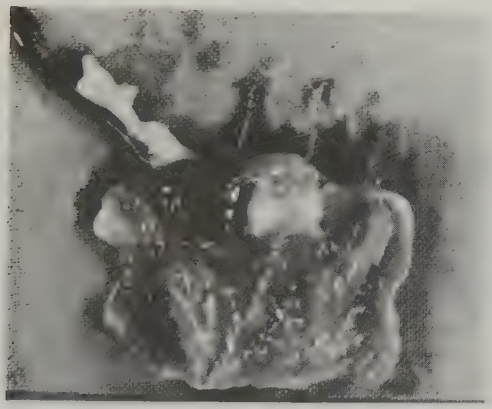


Abb. 6:
Kugelthrombus im rechten Vorhof

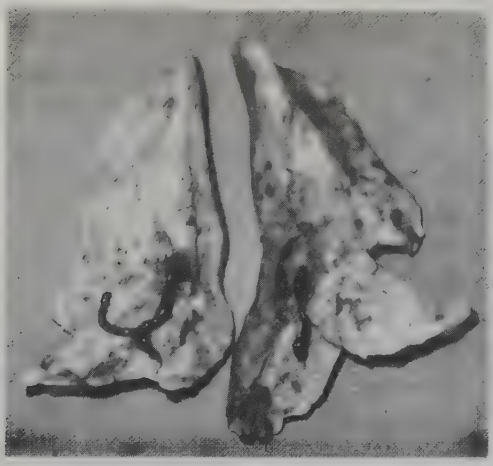


Abb. 7:
Lungenembolie

9. Mörsern

Die einzelnen Muskelstücke wurden ca. 20 Minuten lang in flüssigem Stickstoff zermörsert. Anschließend wurde für die verschiedenen Bestimmungen abgewogen:
0,1 g für die Glucose-, 0,5 g für die Lactat-,
2,0 g für die Pyruvat-, 1,0 g für die F-1.6-$P_2$ und DAP-,
1,0 g für die ATP und 2,5 g für die ADP und AMP-Bestimmung.
Bei jedem Versuchstier wurden von den beiden Muskelstücken eine Bestimmung durchgeführt. Die beiden Ergebnisse wurden gemittelt. Die in Tab. 12 bis 16 dargestellten Einzelwerte sind Mittelwerte dieser beiden Bestimmungen.

10. Bestimmung von Glucose (WERNER et al. 1970)

Testprinzip:

$$\beta\text{-D-Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{GOD} \text{Gluconsäure} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{ABTS (red.)} \xrightarrow{POD} H_2O + \text{ABTS (ox.)}$$

Reagenzien:
Lösung 1: 9,1 mg Glucose/100 ml
Lösung 2: Phosphat-Puffer 100 mmol/l; pH = 7,0
POD $\geq$ 0.8 U/ml; GOD $\geq$ 10 U/ml; ABTS = 1 mg/ml.
Zusatzreagenz: 0.33 N Perchlorsäure

0,1 g Gewebepulver wird in 1,0 ml 0.33 N Perchlorsäure gegeben und gut gemischt. Bei 5000 U/Min. wird 10 Min. zentrifugiert. In Reagenzgläser wird pipettiert:
1. Leerwert: 0,1 ml Aqua bidest. und 5 ml Lösung 2
2. Standard: 0,1 ml Lösung 1 und 5 ml Lösung 2
3. Probe: 0.1 ml Überstand nach Enteiweißung und 5 ml Lösung 2

Anschließend wird gut gemischt. Nach 25-50 Min. bei einer Raumtemperatur von 20-25°C wird die Extinktion

der Probe ($E_p$) und des Standards ($E_S$) gegen den Leerwert bei $\lambda$ = 436 nm gemessen.
Berechnung der Konzentration (c) der Glucose im Gewebe:
$c = 5,55 \times \Delta E$ [mmol/kg FG]; $\Delta E = E_p/E_s$

11. Bestimmung von Lactat (GUTMANN et al. 1974)

Testprinzip:

$$\text{L-Lactat} + NAD^+ \rightleftharpoons^{LDH} \text{Pyruvat} + NADH+H^+$$

Da das Gleichgewicht dieser Reaktion weit auf der Seite von Lactat und $NAD^+$ liegt, wird, um eine Verschiebung des Gleichgewichts nach rechts zu erreichen, ein Glycinpuffer mit pH 9,0 zugegeben, der Protonen aufnimmt. Pyruvat wird dabei als Hydrazon abgefangen. $NAD^+$ wird bei der Bestimmung im Überschuß zugegeben.

Reagenzien:
Lösung 1: 0,5 M Glycinpuffer, pH 9; 0.4 M Hydrazin
Lösung 2: 27 mM $NAD^+$
Suspension 3: LDH $\hat{=}$ 650 U/ml
Zusatzreagenz: 0.6 N Perchlorsäure

0,5 g Gewebepulver wird in 1,0 ml eiskalte, 0.6 N Perchlosäure gegeben, gut gemischt und 10 Min. bei 5000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Reagenzglas abgegossen.
In Reagenzgläser wird pipettiert:
1. Leerwert: 2 ml Lösung 1, 0,2 ml Perchlorsäure,
0,2 ml Lösung 2, 0,02 ml Suspension 3
2. Probe: 2 ml Lösung 1, 0,2 ml Überstand
0,2 ml Lösung 2, 0,02 ml Suspension 3
Anschließend wird gut gemischt und Leerwert und Probe werden genau 1 Stunde bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Die Extinktion der Probe ($E_p$) und des Leerwertes ($E_1$) werden bei $\lambda$ = 365 nm gegen Luft gemessen.

Die Berechnung der Konzentration (c) des Lactats im Gewebe: $c = 10.1 \times \Delta E$ [mmol/kg FG] ; $\Delta E = E_p - E_1$.

12. Bestimmung von Pyruvat (CZOK und LAMPRECHT 1974)

Testprinzip:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH+H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{L-Lactat} + \text{NAD}^+$$

Reagenzien:

Lösung 1: 0,7 M Trikaliumphosphat
Lösung 2: 2,5 mM NADH
Suspension 3: LDH $\geq$ 900 U/ml
Zusatzreagenz: 1.0 N Perchlorsäure

2 g Gewebepulver werden in 2 ml eiskalte, 1,0 N Perchlorsäure gegeben, gut gemischt und bei ca. 5000 U/Min. zentrifugiert. 2 ml Überstand werden mit 1 ml Lösung 1 versetzt, gemischt und ca. 15 Min. stehen gelassen. Nach Abzentrifugieren des Nierderschlags (10 Min., 5000 U/Min.) wird der Überstand auf 25°C erwärmt, 2 ml davon werden in eine Küvette pipettiert, 0,2 ml Lösung 2 werden zugegeben, mit Plastikspatel gemischt und die Extinktion $E_1$ wird gegen Luft bei $\lambda$ = 365 nm gemessen. 0,02 ml Suspension 3 werden zugegeben. Es wird gemischt und der Stillstand der Reaktion abgewartet (ca. 5 Min.). Anschließend wird $E_2$ gemessen.
Berchnung der Konzentration (c) des Pyruvats im Gewebe: $c = 905 \times \Delta E$ [µmol/kg FG] ; $\Delta E = E_1 - E_2$.

13. Bestimmung von Fructose-1.6-diphosphat und Dihydroxyacetonphosphat (MICHAL und BEUTTLER 1974)

Testprinzip:

$$\text{F-1.6-P}_2 \xrightleftharpoons{\text{Aldolase}} \text{DAP} + \text{GAP}$$

$$\text{GAP} \xrightleftharpoons{\text{TIM}} \text{DAP}$$

$$\text{DAP} + \text{NADH+H}^+ \xrightleftharpoons{\text{GDH}} \text{L-(-)Glycerin-3-P} + \text{NAD}^+$$

Reagenzien:

Lösung 1: Kaliumcarbonat (ca. 5 M); ca. 69 g $K_2CO_3$ mit Wasser ad 100 ml lösen.

Lösung 2: 7,7 ml Perchlorsäure (Dichte = 1,67) mit Wasser ad 150 ml verdünnen (ca. 6% w/w $HClO_4$).

Lösung 3: 18,6 g Triäthanolamin-hydrochlorid mit etwa 200 ml Wasser lösen, 18 ml 2 N Natronlauge und 3,7 g EDTA-$Na_2$ · 2 $H_2O$ zufügen; mit Wasser ad 250 ml auffüllen (= 0,4 M Triäthanolamin-Puffer, pH = 7,6).

Lösung 4: 7 mg NADH-$Na_2$ mit Lösung 3 ad 1,5 ml lösen (= ca. 5 mM β-NADH).

Suspension 5: Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH): ca. 2 mg Protein/ml Wasser.

Suspension 6: Triosephosphat-Isomerase (TIM): ca. 50 µg Protein/ml Wasser

Lösung 8: 1 g Kaliumdichromat mit Wasser ad 100 ml ca. 1% w/v $K_2Cr_2O_2$.

1 g Gewebepulver wird in 5 ml Lösung 2 (Perchlorsäure) eingebracht, gemischt und 10 Min. bei ca. 5000 U/Min. zentrifugiert. In eine Glasküvette wird pipettiert:

1. 1,5 ml Lösung 3, 1,5 ml enteiweißte Probe, 0,01 ml Lösung 4 werden gemischt, auf Raumtemperatur gebracht und die Anfangsextinktion $E_1$ wird bei $\lambda$ = 340 nm im Abstand von 3 Min. gemessen.
2. Zugabe von 0,01 ml Suspension 5. Mischen. Nach Ablauf der Reaktion (3-5 Min.) wird die Extinktion $E_2$ im Abstand von 3 Min. mehrmals gemessen.
   $\Delta E_{DAP} = E_1 - E_2$
3. Zugabe von 0,01 ml Suspension 6. Mischen. Nach Ablauf der Reaktion (3-5 Min.) wird die Extinktion $E_3$ im Abstand von 2 Min. mehrmals abgelesen.

4. Zugabe von 0,01 ml Suspension 7. Mischen. Nach Ablauf der Reaktion (6-9 Min.) wird die Extinktion $E_4$ im Abstand von 3 Min. mehrmals abgelesen.

$$\Delta E_{F\text{-}1.6\text{-}P_2} = E_3 - E_4$$

Konzentration (c) von DAP im gewebe:

$$c = 0{,}324 \times \Delta E_{DAP} \quad [\mu mol/kg\ FG]$$

Konzentration (c) von F-1.6-$P_2$ im gewebe:

$$c = 0{,}163 \times \Delta E_{F\text{-}1.6\text{-}P_2} \quad [\mu mol/kg\ FG]$$

14. Bestimmung von ATP (BÜCHER 1947)

Testprinzip:

$$\text{Glycerat-3-P} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{PGK}} \text{Glycerat-1,3-P}_2 + \text{ADP}$$

$$\text{Clycerat-1,3-P}_2 + \text{NADH+H}^+ \xrightarrow{\text{GAPDH}} \text{GAP} + \text{Pi} + \text{NAD}^+$$

$$\text{GAP} \xrightarrow{\text{TIM}} \text{DAP}$$

$$\text{DAP} + \text{NADH+H}^+ \xrightarrow{\text{GDH}} \text{Glycerin-1-P} + \text{NAD}^+$$

Reagenzien:

Lösung 1: Triäthanolamin-Puffer, 0,5 molar, pH 7,6;
4 mM $MgSO_4$; 6 mM Glycerat-3-P;

Lösung 2: 2,5 mM NADH

Suspension 3: GAPDH $\geq$ 560 U/ml; PGK $\geq$ 450 U/ml;
GDH $\geq$ 80 U/ml; TIM $\geq$ 1000 U/ml;

Zusatzreagenz: 0,6 N Perchlorsäure

1 g Gewebepulver wird in eiskalte, 0,6 N Perchlorsäure gegeben, gut gemischt, 10 Min. bei 20-25°C stehen gelassen und dann 10 Min. bei ca.5000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird sofort abgegossen.
In eine Glasküvette wird pipettiert:
2,0 ml Lösung 1; 0,2 ml Lösung 2; 0,2 ml Überstand nach Enteiweißung. Mit Plastikspatel wird gemischt und die Extinktion $E_1$ bei $\lambda$ = 365 nm gegen Luft gemessen.

Suspension 3 wird zugegeben, gemischt und der Stillstand der Reaktion (ca. 10 Min.) abgewartet. Dann wird die Extinktion $E_2$ gemessen.
Berechnung der Konzentration (c) von ATP im Gewebe:
$c = 8{,}627 \times \Delta E$ [mmol/kg FG]; $\Delta E = E_1 - E_2$.

15. Bestimmung von ADP und AMP (ADAM 1970)

Testprinzip:

$$AMP + ATP \xrightleftharpoons{MK} 2\ ADP$$

$$2ADP + 2PEP \xrightleftharpoons{PK} 2\ ATP + 2\ Pyruvat$$

$$2\ Pyruvat + 2\ NADH+H^+ \xrightleftharpoons{LDH} 2\ Lactat + 2\ NAD^+$$

Reagenzien:
Lösung 1: 0.5 M Triäthanolamin-HCl; 2,0 M $K_2CO_3$
Lösung 2: 10 mM PEP; 1,3 M KCl; 0,4 M $MgSO_4$
Lösung 3: 2,5 mM NADH
Suspension 4: LDH $\geq$ 320 U/ml
Suspension 5: PK $\geq$ 320 U/ml
Suspension 6: MK $\geq$ 500 U/ml
Zusatzreagenz: 1,0 N Perchlorsäure

2,5 g Gewebepulver werden in 5 ml 1,0 N, eiskalte Perchlorsäure gegeben, gut gemischt und 10 Min. bei ca. 5000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird sofort vom Niederschlag abgegossen. 1,0 ml Lösung 1 wird zu 5 ml Überstand zugegeben, gemischt, 10 Min. im Eisbad stehen gelassen, filtriert und das Filtrat wird anschließend auf 25°C erwärmt.
In eine Glasküvette wird pipettiert:
Filtrat 2,0 ml; 0,2 ml Lösung 2; 0,2 ml Lösung 3; 0,02 ml Suspension 4; mit Plastikspatel wird gemischt und nach 5 Min. $E_1$ bei $\lambda$ = 365 nm gegen Luft gemessen.
0,02 ml Suspension 5 werden zugegeben, gemischt,und

der Stillstand der Reaktion wird abgewartet (ca. 15 Min.). Die Extinktion $E_3$ wird gemessen.
Berechnung der Konzentration (c) von ADP im Gewebe:
$c = 1638,6 \times (E_1 - E_2)$ [µmol/kg FG].
Berechnung der Konzentration (c) von AMP im Gewebe:
$c = 823,8 \times (E_2 - E_3)$ [µmol/kg FG].

16. Statistik

Als statistische Methoden wurden angewandt:
der t-Test nach GOSSET (Pseudonym: Student in CAVALLI-SFORZA 1972)
der F-Test nach FISHER (in CAVALLI-SFORZA 1972) und
der ASPIN-Test

Der t-Test nach GOSSET ist gültig, wenn eine Normalverteilung vorliegt und die Stichprobenvarianzen in den zu vergleichenden Gruppen übereinstimmen. Die Normalverteilung wurde durch Vergleich der Werte mit einer Wahrscheinlichkeitstabelle für Normalverteilung und durch Symmetrievergleich zu beiden Seiten des Mittelwertes überprüft. Die Gleichheit der Stichprobenvarianzen der zu vergleichenden Gruppen wurde mit dem F-Test nach FISHER geprüft. Waren die Varianzen nicht gleich, so wurde anstatt des t-Tests der ASPIN-Test angewandt, der ebenfalls die Voraussetzung einer Normalverteilung hat, nicht jedoch die Gleichheit der Varianzen. Ein Ergebnis betrachtet man im allgemeinen dann als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit P kleiner als 5%, d.h., wenn das Signifikanzniveau $P \leq 0,05$ ist.

## C. Ergebnisse

Im experimentellen Teil (Methoden) wurde erwähnt, daß bei jedem Versuchstier zwei Muskelstücke entnommen wurden. Mit jedem Muskelstück wurde die Metabolitbestimmung durchgeführt. Die in den Tab. 12 bis 16 aufgeführten Einzelergebnisse sind Mittelwerte dieser zwei Bestimmungen bei jedem Versuchstier. Sämtliche Analysen auf AMP im Muskel ergaben bei der Methode nach ADAM (1970) den Wert 0.
In den Tab. 3 bis 11 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertungen dargestellt. Mit den Abb. 8 bis 15 kann man sich einen schnellen Überblick über die Metabolitveränderungen verschaffen. Dabei sind die Mittelwerte und die mittleren Fehler der Mittelwerte dargestellt, nicht jedoch die Standardabweichungen.
- schraffierte Fläche: Metabolite von Tieren der Kontrollgruppe (2 ml 0.9% NaCl)
- gestrichelte Linie: Metabolite von Tieren mit 2 mg Nativ-Protein/kg KG
- durchgezogenen Linie: Metabolite von Tieren mit 2 mg verbr. Protein (Toxin)/kg KG

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:
$\bar{x}$ = Mittelwert
$s_m$ = mittlerer Fehler des Mittelwertes
s = Standardabweichung
P = Signifikanzwahrscheinlichkeit nach dem t-Test
$P^+$ = Signifikanzwahrscheinlichkeit nach dem ASPIN-Test
N = Anzahl der Versuchstiere

Die Ergebnisse werden als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit P, bzw. $P^+$, kleiner als

5%, d.h., wenn das Signifikanzniveau P, bzw. $P^+$, $\leq$ 0.05 ist.

Die Werte sind nur dann ausgedruckt, wenn sich ein signifikanter Unterschied ergab.

Metabolitkonzentrationen im Muskel:

Tab. 3: Glucose

| | NaCl 4Std. | Nativ 4Std. | Nativ 24Std. | Toxin 4Std. | Toxin 24Std. |
|---|---|---|---|---|---|
| N = | 6 | 6 | 10 | 6 | 10 |
| $\bar{x}$ = | 2,38 | 1,80 | 0,42 | 0,41 | 11,01 |
| $s_m$ = | 0,76 | 0,90 | 0,17 | 0,16 | 1,39 |
| s = | 1,85 | 2,21 | 0,55 | 0,39 | 4,41 |

Signifikante Werte:

NaCl 4Std. - Nativ 24Std. $P^+ < 0,01$
NaCl 4Std. - Toxin 4Std. $P^+ < 0,05$
NaCl 4Std. - Toxin 24Std. $P^+ < 0,01$
Toxin 4Std. - Toxin 24Std. $P^+ < 0,01$
Nativ 24Std.- Toxin 24Std. $P^+ < 0,01$

Tab. 4: Lactat

| | NaCl 4Std. | Nativ 4Std. | Nativ 24Std. | Toxin 4Std. | Toxin 24Std. |
|---|---|---|---|---|---|
| N = | 6 | 6 | 10 | 6 | 10 |
| $\bar{x}$ = | 5,86 | 6,20 | 6,18 | 6,33 | 5,54 |
| $s_m$ = | 0,94 | 0,65 | 0,32 | 0,50 | 0,23 |
| s = | 1,85 | 1,60 | 1,01 | 1,23 | 0,74 |

Metabolitkonzentrationen im Muskel:

Tab. 5: Pyruvat

| | NaCl 4Std. | Nativ 4Std. | Nativ 24Std. | Toxin 4Std. | Toxin 24Std. |
|---|---|---|---|---|---|
| N = | 6 | 6 | 10 | 6 | 10 |
| $\bar{x}$ = | 0,321 | 0,379 | 0,338 | 0,369 | 0,471 |
| $s_m$ = | 0,029 | 0,044 | 0,038 | 0,090 | 0,039 |
| s = | 0,070 | 0,108 | 0,120 | 0,221 | 0,123 |

Signifikante Werte:

NaCl 4Std. - Toxin 24Std. $P < 0,02$

Nativ 24Std. - Toxin 24Std. $P < 0,02$

Tab. 6: Lactat/Pyruvat-Quotient

| | NaCl 4Std. | Nativ 4Std. | Nativ 24Std. | Toxin 4Std. | Toxin 24Std. |
|---|---|---|---|---|---|
| N = | 6 | 6 | 10 | 6 | 10 |
| $\bar{x}$ = | 19,42 | 17,67 | 19,43 | 23,23 | 12,27 |
| $s_m$ = | 4,22 | 2,62 | 1,22 | 5,81 | 0,88 |
| s = | 10,33 | 6,42 | 3,85 | 14,22 | 2,79 |

Signifikante Werte:

Toxin 4Std. - Toxin 24Std. $P^{+} < 0,05$

Nativ 24Std. - Toxin 24Std. $P < 0,01$

Metabolitkonzentratinen im Muskel:

Tab. 7: Fructose-1.6-diphosphat

| | NaCl 4Std. | Nativ 4SCd. | Nativ 24Std. | Toxin 4Std. | Toxin 24Std. |
|---|---|---|---|---|---|
| N = | 6 | 6 | 10 | 6 | 10 |
| $\bar{x}$ = | 0,056 | 0,055 | 0,061 | 0,074 | 0,050 |
| $s_m$ = | 0,009 | 0,013 | 0,004 | 0,007 | 0,006 |
| s = | 0,022 | 0,032 | 0,012 | 0,016 | 0,019 |

Signifikanter Wert:
Toxin 4Std. - Toxin 24Std. $P < 0,02$

Tab. 8: Dihydroxyacetonphosphat

| | NaCl 4Std. | Nativ 4Std. | Nativ 24Std. | Toxin 4Std. | Toxin 24Std. |
|---|---|---|---|---|---|
| N = | 6 | 6 | 10 | 6 | 10 |
| $\bar{x}$ = | 0,073 | 0,105 | 0,108 | 0,101 | 0,135 |
| $s_m$ = | 0,009 | 0,016 | 0,007 | 0,014 | 0,012 |
| s = | 0,022 | 0,040 | 0,023 | 0,035 | 0,039 |

Signifikante Werte:
NaCl 4Std. - Nativ 24Std. $P < 0,02$
NaCl 4Std. - Toxin 24Std. $P < 0,005$

Metabolitkonzentrationen im Muskel:

Tab. 9: ATP

| | NaCl 4Std. | Nativ 4Std. | Nativ 24Std. | Toxin 4Std. | Toxin 24Std. |
|---|---|---|---|---|---|
| N = | 6 | 6 | 10 | 6 | 10 |
| $\bar{x}$ = | 5,88 | 5,36 | 5,82 | 5,23 | 5,52 |
| $s_m$ = | 0,26 | 0,22 | 0,07 | 0,19 | 0,13 |
| s = | 0,63 | 0,55 | 0,23 | 0,47 | 0,40 |

Signifikanter Wert:

Nativ 4Std. - Nativ 24Std. $P^+ < 0,05$

Tab. 10: ADP

| | NaCl 4Std. | Nativ 4Std. | Nativ 24Std. | Toxin 4Std. | Toxin 24.Std. |
|---|---|---|---|---|---|
| N = | 6 | 6 | 10 | 6 | 10 |
| $\bar{x}$ = | 0,899 | 0,737 | 0,620 | 0,684 | 0,606 |
| $s_m$ = | 0,085 | 0,216 | 0,056 | 0,070 | 0,058 |
| s = | 0,208 | 0,530 | 0,176 | 0,171 | 0,184 |

Signifikante Werte:

NaCl 4Std. - Nativ 24Std. $P < 0,02$

NaCl 4Std. - Toxin 24Std. $P < 0,02$

Tab. 11:

Lactatkonzentrationen im Serum:

| | NaCl 90Min. | Nativ 90Min. | Toxin 90Min. |
|---|---|---|---|
| N = | 5 | 6 | 6 |
| $\bar{x}$ = | 1,57 | 2,20 | 2,54 |
| s = | 0,48 | 0,65 | 0,97 |

| | NaCl 4Std. | Nativ 4Std. | Toxin 4Std. |
|---|---|---|---|
| N = | 5 | 4 | 5 |
| $\bar{x}$ = | 2,21 | 4,03 | 3,83 |
| s = | 1,50 | 1,71 | 2,14 |

Abb. 8: G L U C O S E

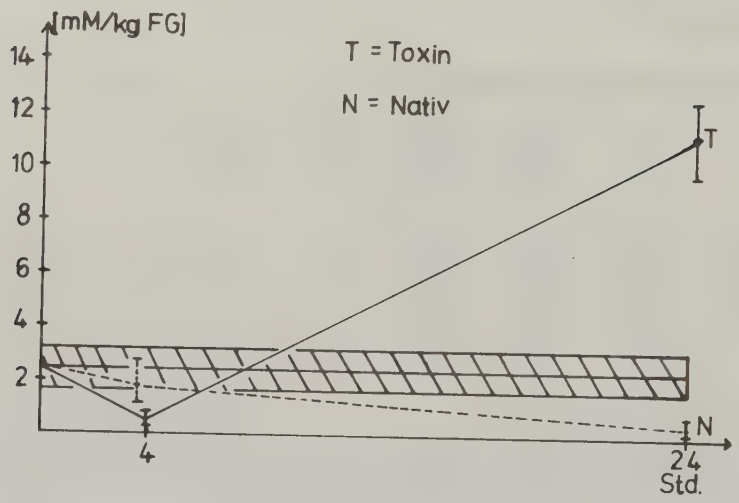



Abb. 9: L A C T A T

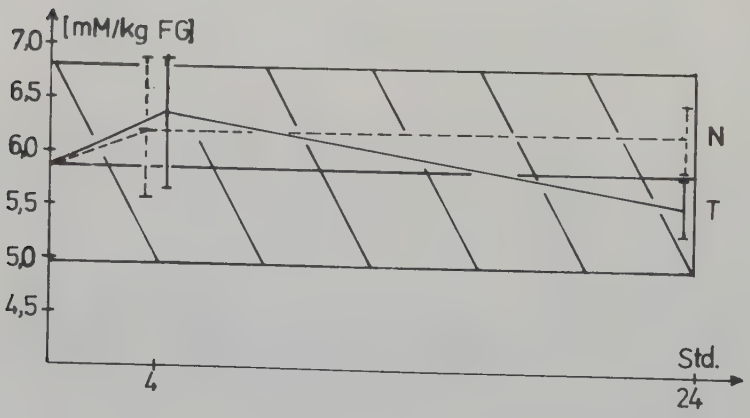


Abb. 10: P Y R U V A T

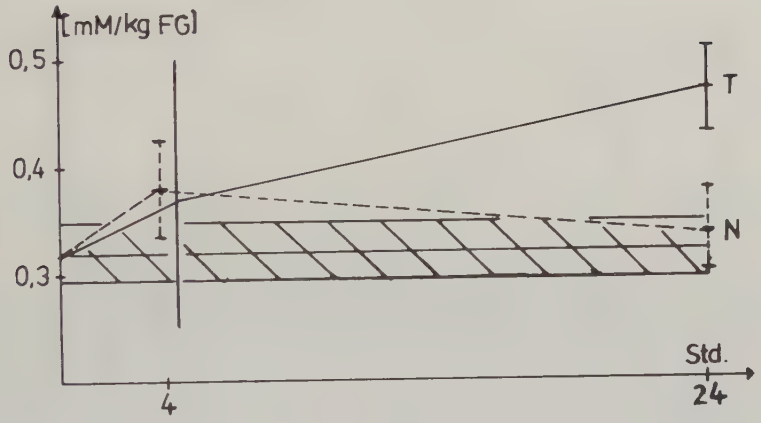



Abb. 11: L A C T A T / P Y R U V A T

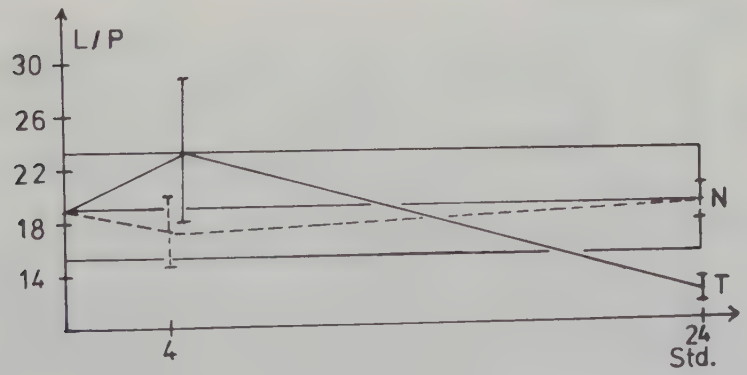


Abb. 12: F - 1.6 - $P_2$

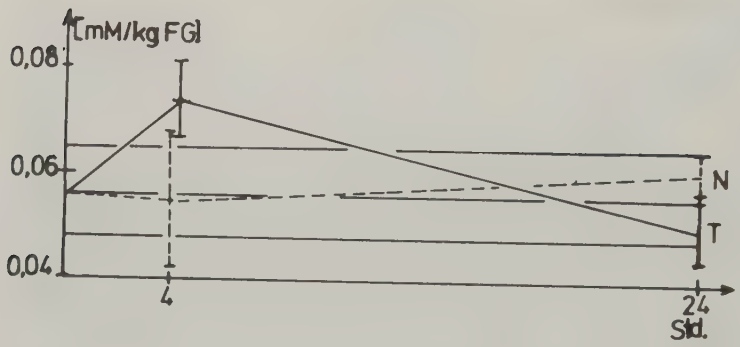



Abb. 13: D A P

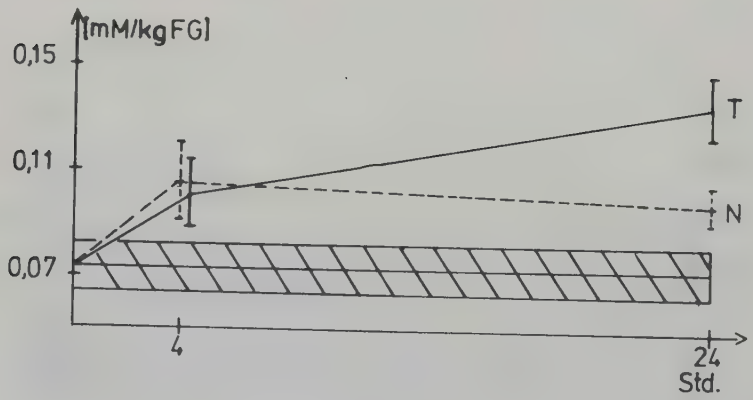


Abb. 14: A T P

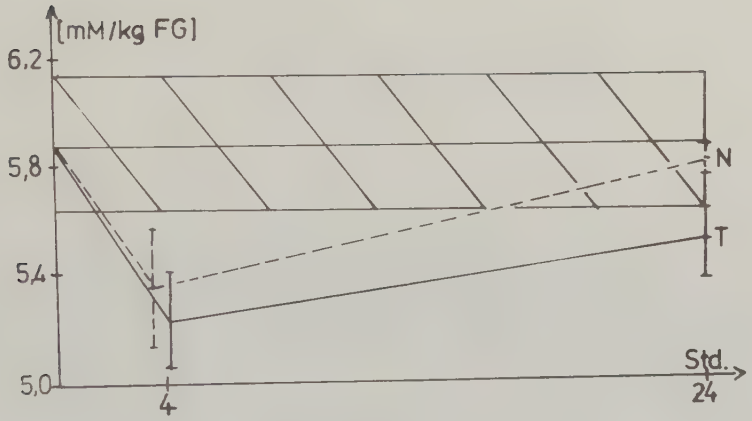
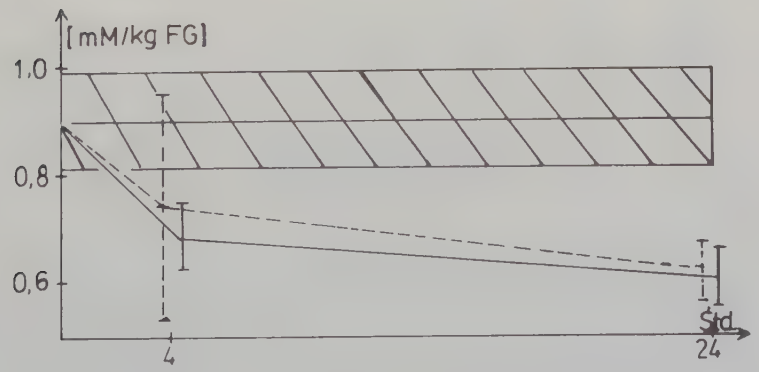



Abb. 15: A D P



Tab. 12: Gruppe 1

(2 ml 0,9% NaCl; Organentnahme nach 4 Stunden)

[mmol/kg FG]

| Nr. | Glucose | Lactat | Pyruvat | L/P | F-1.6-$P_2$ | DAP | ATP | ADP | AMP |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4,45 | 5,78 | 0,301 | 19,20 | 0,086 | 0,032 | 5,92 | 0,665 | 0 |
| 2 | 4,20 | 4,06 | 0,418 | 9,18 | 0,034 | 0,091 | 5,06 | 0,681 | 0 |
| 3 | 1,67 | 8,38 | 0,375 | 22,35 | 0,039 | 0,079 | 5,68 | 0,945 | 0 |
| 4 | 3,23 | 2,30 | 0,322 | 7,14 | 0,073 | 0,093 | 5,53 | 0,926 | 0 |
| 5 | 0,43 | 7,36 | 0,217 | 33,92 | 0,065 | 0,079 | 6,89 | 0,947 | 0 |
| 6 | 0,27 | 7,26 | 0,293 | 24,78 | 0,039 | 0,065 | 6,22 | 1,229 | 0 |

Tab. 13: Gruppe 2

(2 mg Nativprotein/kg Körpergewicht; Organentnahme nach 4 Stunden)

[mmol/kg FG]

| Nr. | Glucose | Lactat | Pyruvat | L/P | F-1.6-$P_2$ | DAP | ATP | ADP | AMP |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7 | 3,51 | 6,40 | 0,276 | 23,19 | 0,021 | 0,122 | 5,25 | 1,777 | 0 |
| 8 | 0,83 | 5,95 | 0,339 | 17,55 | 0,063 | 0,046 | 5,77 | 0,716 | 0 |
| 9 | 5,52 | 3,45 | 0,511 | 6,75 | 0,019 | 0,145 | 5,24 | 0,520 | 0 |
| 10 | 0,41 | 8,31 | 0,513 | 16,20 | 0,066 | 0,136 | 4,39 | 0,271 | 0 |
| 11 | 0,00 | 6,98 | 0,279 | 25,02 | 0,103 | 0,066 | 5,58 | 0,603 | 0 |
| 12 | 0,53 | 6,11 | 0,353 | 17,31 | 0,061 | 0,117 | 5,94 | 0,533 | 0 |

Tab. 14: Gruppe 3

(2 mg Toxin/kg Körpergewicht; Organentnahme nach 4 Stunden)

[mmol/kg FG]

| Nr. | Glucose | Lactat | Pyruvat | L/P | F-1.6-$P_2$ | DAP | ATP | ADP | AMP |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 13 | 0,25 | 5,37 | 0,113 | 47,52 | 0,090 | 0,040 | 5,57 | 0,861 | 0 |
| 14 | 0,14 | 5,71 | 0,171 | 33,39 | 0,088 | 0,079 | 5,52 | 0,622 | 0 |
| 15 | 0,59 | 8,03 | 0,547 | 14,68 | 0,063 | 0,130 | 5,76 | 0,904 | 0 |
| 16 | 1,13 | 7,49 | 0,687 | 10,90 | 0,082 | 0,130 | 4,55 | 0,633 | 0 |
| 17 | 0,29 | 4,92 | 0,293 | 16,79 | 0,070 | 0,106 | 4,88 | 0,641 | 0 |
| 18 | 0,08 | 6,43 | 0,400 | 16,08 | 0,049 | 0,118 | 5,10 | 0,442 | 0 |

Tab. 15: Gruppe 4

(2 mg Nativ-Protein/kg Körpergewicht; Organentnahme nach 24 Stunden)

[mmol/kg FG]

| Nr. | Glucose | Lactat | Pyruvat | L/P | F-1.6-$P_2$ | DAP | ATP | ADP | AMP |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 19 | 0,91 | 7,80 | 0,483 | 16,15 | 0,070 | 0,099 | 5,54 | 0,338 | 0 |
| 20 | 0,67 | 5,29 | 0,246 | 21,50 | 0,079 | 0,095 | 5,68 | 0,551 | 0 |
| 21 | 0,00 | 6,34 | 0,324 | 19,57 | 0,052 | 0,078 | 5,59 | 0,673 | 0 |
| 22 | 0,00 | 4,75 | 0,205 | 23,17 | 0,052 | 0,096 | 5,95 | 0,702 | 0 |
| 23 | 0,67 | 6,71 | 0,378 | 17,75 | 0,040 | 0,145 | 5,91 | 0,530 | 0 |
| 24 | 0,04 | 5,52 | 0,214 | 25,79 | 0,066 | 0,100 | 5,60 | 0,792 | 0 |
| 25 | 0,15 | 5,66 | 0,314 | 18,03 | 0,053 | 0,153 | 5,75 | 0,632 | 0 |
| 26 | 0,08 | 7,27 | 0,546 | 13,32 | 0,071 | 0.114 | 6,28 | 0,771 | 0 |
| 27 | 1,63 | 5,34 | 0,234 | 22,82 | 0,059 | 0,096 | 5,85 | 0,853 | 0 |
| 28 | 0,00 | 7,10 | 0,438 | 16,21 | 0,069 | 0,108 | 6,05 | 0,355 | 0 |

Tab. 16: Gruppe 5

(2 mg Toxin/kg Körpergewicht; Organentnahme nach 24 Stunden)

[mmol/kg FG]

| Nr. | Glucose | Lactat | Pyruvat | L/P | F-1.6-$P_2$ | DAP | ATP | ADP | AMP |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 29 | 9,46 | 5,28 | 0,556 | 9,50 | 0,061 | 0,113 | 5,33 | 0,374 | 0 |
| 30 | 10,46 | 4,10 | 0,309 | 13,27 | 0,065 | 0,088 | 5,24 | 0,596 | 0 |
| 31 | 11,51 | 4,81 | 0,396 | 12,15 | 0,058 | 0,130 | 4,94 | 0,550 | 0 |
| 32 | 19,06 | 5,62 | 0,413 | 13,61 | 0,072 | 0,091 | 5,34 | 0,905 | 0 |
| 33 | 17,29 | 6,52 | 0,365 | 17,86 | 0,075 | 0,089 | 5,23 | 0,878 | 0 |
| 34 | 10,36 | 5,90 | 0,713 | 8,28 | 0,029 | 0,189 | 5,41 | 0,369 | 0 |
| 35 | 11,46 | 4,99 | 0,440 | 11,34 | 0,036 | 0,183 | 5,60 | 0,650 | 0 |
| 36 | 9,26 | 6,30 | 0,436 | 14,45 | 0,039 | 0,157 | 6,07 | 0,650 | 0 |
| 37 | 3,81 | 5,85 | 0,468 | 12,50 | 0,040 | 0,144 | 5,93 | 0,635 | 0 |
| 38 | 7,46 | 6,00 | 0,618 | 9,71 | 0,022 | 0,168 | 6,12 | 0,452 | 0 |

Tab. 17:

Lactatkonzentrationen im Serum [mmol/l]

| a. nach 90 Minuten: | | | b. nach 4 Stunden | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NaCl | Nativ | Toxin | NaCl | Nativ | Toxin |
| 1,78 | 2,26 | 1,64 | 4,46 | 3,30 | 1,70 |
| 1,88 | 1,66 | 4,38 | 2,97 | 6,27 | 1,31 |
| 1,65 | 1,31 | 2,52 | 1,26 | 2,27 | 5,09 |
| 1,82 | 2,14 | 2,57 | 1,53 | 4,29 | 5,63 |
| 0,72 | 2,75 | 1,93 | 0,81 | | 5,43 |
| | 3,06 | 2,19 | | | |

D. Diskussion

Die Veränderungen des Stoffwechsels 4 Stunden nach Toxingabe sprechen für eine relative Minderdurchblutung der Muskulatur, für einen Schock.

Unter Katecholaminwirkung erfolgt beim Schock eine Zentralisation des Blutkreislaufs, wobei die Muskulatur gleichzeitig mit Insulin, Sauerstoff und Glucose schlecht versorgt wird. Dabei kommt es zu einer verminderten Glucoseaufnahme in die Zelle und der intrazelluläre Glucosegehalt nimmt ab (Abb. 8).

Durch Aktivierung der PFK, dem Schlüsselenzym der Glykolyse, nehmen 4 Stunden nach Toxingabe die intrazellulären Konzentrationen von F-1.6-$P_2$ und DAP deutlich zu (Abb. 12 und 13). Bei Insulinmangel, jedoch guter Sauerstoffversorgung, nähme die Aktivität der PFK ab. Besteht wie hier ein relativer Sauerstoffmangel, wird die Aktivität der PFK gesteigert, die F-1.6-$P_2$ Konzentration im Gewebe nimmt zu und G-6-P nimmt ab trotz gesteigerter Glykogenolyse (REGEN et al. 1961). Für Sauerstoffmangel sprechen der Anstieg des Lactat/Pyruvat-Quotienten und die ATP-Abnahme (Abb. 11 und 14).

Als Zeichen verstärkter Glykolyse kommt es 4 Stunden nach Toxingabe zu einem Anstieg der Lactat- und Pyruvatkonzentrationen im Muskel (Abb. 9 und 10).

Im Vergleich mit Literaturwerten (Tab. 2) sind die Lactat- und Pyruvatkonzentrationen bei den Kontrolltieren schon relativ hoch, wobei jedoch der L/P-Quotient in der Norm liegt. Der normale Lactat/Pyruvat-Quotient und die hohen ATP-Konzentrationen bei der Kontrollgruppe sprechen dagegen, daß diese Veränderungen durch verzögertes Einfrieren des Gewebes

entstanden sind. Die Veränderungen sind wahrscheinlich durch die lange Pentobarbitalnarkose bedingt, wobei es zu einer gesteigerten Glykolyse kommt(S.25).

Unter anaeroben Bedingungen ist die Glykolyse im Muskel die Hauptenergiequelle. Bei der Glykolyse wird $NAD^+$ zu $NADH+H^+$ reduziert. $NADH+H^+$ wird nun bei der Umwandlung von Pyruvat in Lactat oxidiert und $NAD^+$ steht wieder für die Glykolyse zur Verfügung.

Der Lactatanstieg im Muskel ist relativ gering, obwohl die Blutlactatkonzentrationen deutlich ansteigen (Tab. 11). Der L/P-Quotient, ein Indikator für die Sauerstoffversorgung des Gewebes, steigt ebenfalls an.

Die ATP-Abnahme weist auf einen relativen Sauerstoffmangel im Muskel hin (Abb. 14). Die ADP-Konzentrationen (Abb. 15) nehmen ebenfalls ab. AMP konnte in dieser Arbeit mit der Methode von ADAM (1970) im Muskel nicht nachgewiesen werden. Bei Abnahme der energiereichen Phosphate ATP und ADP wird aus Gründen des Reaktionsgleichgewichts in der durch die Adenylat-Kinase (Myokinase) katalysierten Reaktion

$$ATP + AMP \rightleftharpoons ADP + ADP$$

auch AMP abnehmen. AMP wird dabei vermutlich durch die Adenylat-Desaminase zu IMP abgebaut.

Vier Stunden nach Gabe des nativen Proteins aus der Mäusehaut wurden tendenziell dieselben Stoffwechselveränderungen beobachtet.

Es scheint, daß Toxin und Nativ einen Schock bewirken und damit die periphere Durchblutung verringern. Es wurden bei den meisten Tieren nach intravenöser Injektion von Toxin und Nativ-Protein Thromben im rechten Vorhof, im rechten Ventrikel und teilweise auch in den Lungenarterien gefunden (Abb. 6 und 7).

Möglich ist auch, daß es in der Peripherie zu Mikrothromben und damit zur Minderdurchblutung kommt.

Die Metabolitveränderungen 4 Stunden nach Toxin- und Nativ-Injektion sprechen also für einen Schockzustand, wobei der geringe Lactatanstieg im Muskel vermutlich durch die lange Pentobarbitalnarkose bedingt ist.

Die Diskussion der Stoffwechselveränderungen 24 Stunden nach intravenöser Injektion des Verbrennungstoxins ist etwas schwieriger. MEYER (1977) fand bei unseren Versuchen einen Glucoseanstieg in der Leber von 14 mM auf 29 mM/kg FG. Man kann annehmen, daß zwischen Leber und Blut die Glucose diffundiert und daß dazu Insulin nicht nötig ist (CAHILL et al. 1959). Bei dieser Annahme ist die Blutglucosekonzentration annähernd gleich der Konzentration der Glucose in der Leber. Der Blutzuckergehalt steigt also von 250 mg% bei der Kontrollgruppe auf 520 mg% Glucose an. Bei Vergleich mit dem Glucosewert 4 Stunden nach Toxingabe ergibt sich ein Anstieg der Blutglucose um ca. 380 mg%.

Etwas schwierig ist dabei der Anstieg der intrazellulären Glucose zu erklären (Abb. 8). Bei Insulinmangel ist die Aufnahme der Glucose in die Muskelzelle erschwert. Auch ist bei einer diabetischen Stoffwechsellage die Hexokinaseaktivität stark vermindert. Bei gleichzeitigem Sauerstoffmangel wäre wohl die Glucoseaufnahme in die Muskelzelle gesteigert. Sauerstoffmangel jedoch aktiviert die PFK trotz des Insulindefizits und der intrazelluläre Glucosegehalt nähme ab.

Die PFK jedoch ist in unseren Versuchen eher gehemmt, die F-1.6-$P_2$ Konzentration liegt leicht unter der Norm (Abb. 12). Die Zunahme der intrazellulären Glucosekonzentration ließe sich also nur durch eine gesteigerte Glykogenolyse erklären. Durch eine verstärkte Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark könnte dies erreicht werden.

Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die Insulinkonzentrationen im Serum normal oder vielleicht sogar erhöht sind. Trotzdem besteht ein relativer Insulinmangel, wenn Hormone, die als Insulinantagonisten wirken, vermehrt ins Blut abgegeben werden, wie dies auch bei Verbrennungen immer beobachtet wird (BATSTONE et al. 1976):

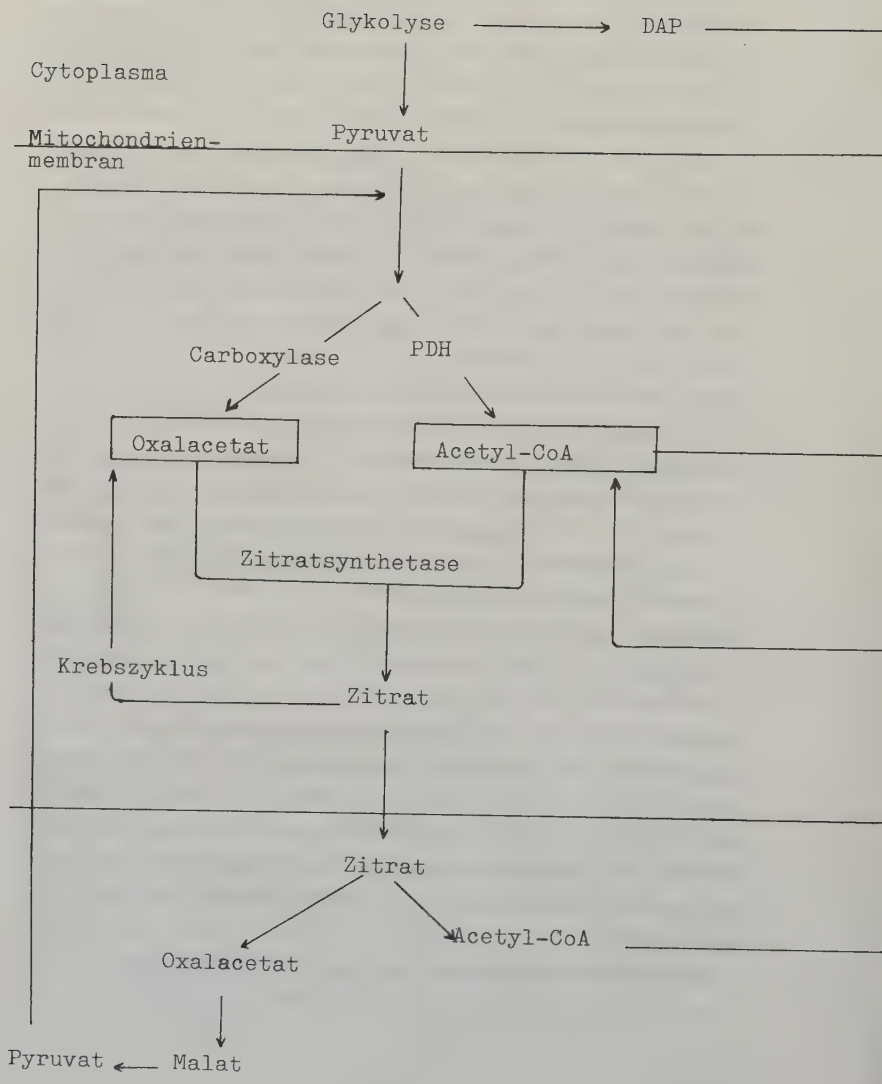
Katecholamine aus dem Nebennierenmark, die eine Glykogenolyse und Lipolyse bewirken;

Glucocorticoide aus der Nebennierenrinde, die hauptsächlich in der Peripherie Lipide und Proteine abbauen, in der Leber die Gluconeogenese aus Aminosäuren beschleunigen und damit die Blutglucosekonzentration steigern;

Glukagon, das selektiv in der Leber die Glykogenolyse steigert, in der Peripherie Lipide und Proteine abbaut.

Insulin könnte unter diesen Bedingungen noch ausreichen, einen gewissen Glucosetransport in die Zelle zu erzwingen, insbesondere bei hohen Glucosekonzentrationen im Blut. Wenn zusätzlich Katecholamine im Muskel den Glykogenabbau stimulieren, kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Glucosekonzentration (Abb. 8).

Der Sauerstoffmangel, welcher 4 Stunden nach Toxingabe zu einer Aktivierung der PFK und einem


Glykolyse
DAP
Cytoplasma
Pyruvat
Mitochondrien-
membran
Carboxylase
PDH
Oxalacetat
Acetyl-CoA
Zitratsynthetase
Krebszyklus
Zitrat
Zitrat
Acetyl-CoA
Oxalacetat
Pyruvat
Malat

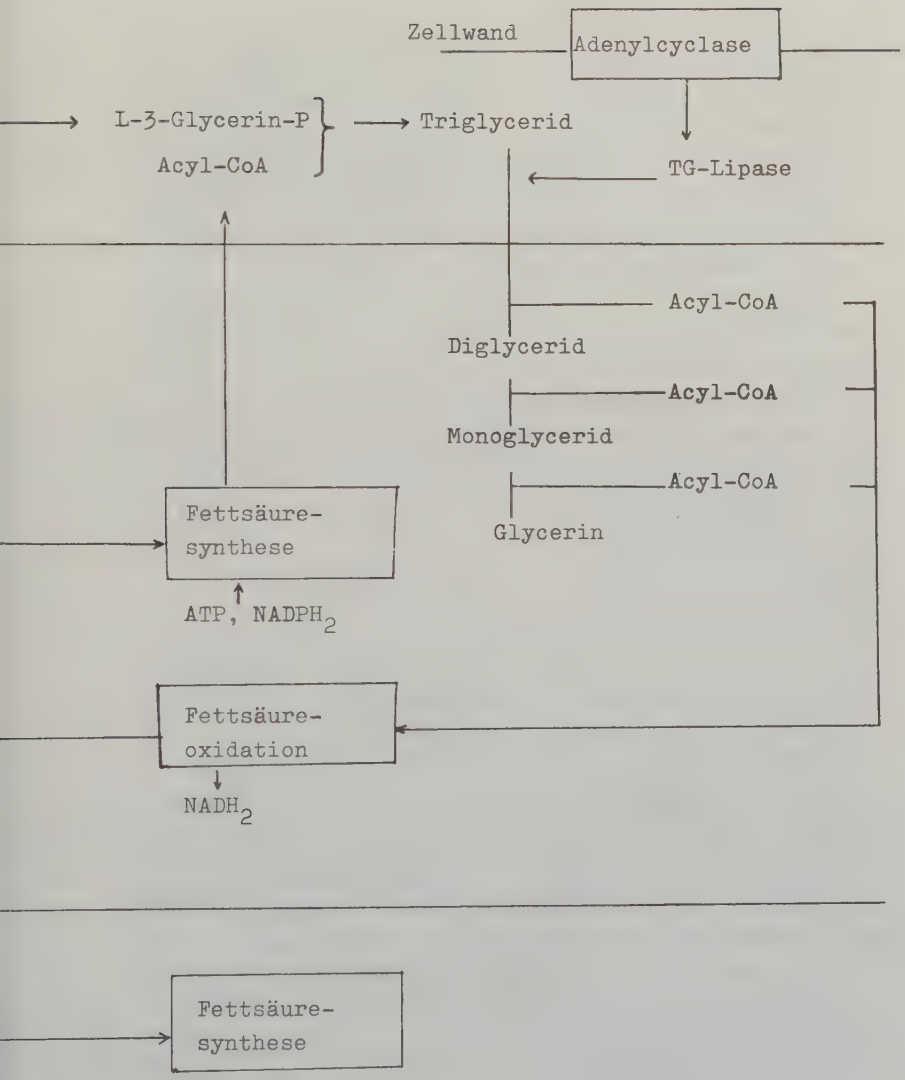



Abb. 16: Schematische Darstellung über das Zusammenwirken von Glykolyse, Fetthaushalt und Zitronensäurezyklus.

Anstieg der F-1.6-$P_2$ Konzentration geführt hat, ist weitgehend behoben, und die F-1.6-$P_2$ Konzentration zeigt keinen Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb. 12). Jedoch führen Katecholamine zu einer Aktivierung der PFK. Bei der bestehenden diabetischen Stoffwechsellage aber hemmt der Insulinmangel die PFK-Aktivität deutlich. Unter diesen Bedingungen dürften also die hemmenden Faktoren leicht überwiegen.

Der Anstieg der intrazellulären DAP-Konzentration (Abb. 13) kann einerseits durch die Aktivierung der Fructosediphosphat-Aldolase bedingt sein. Andererseits könnte der Metabolismus von DAP gestört sein. Wenn unter den oben gezeigten Bedingungen die Lipolyse stark ansteigt, die Lipogenese jedoch behindert ist, wird die Umwandlung von DAP in Glycerin-1-P, das zur Triglyceridsynthese dient, behindert sein. Bei der Glykolyse wird DAP durch die Triosephosphat-Isomerase (TIM) in Glycerinaldehyd-3-P umgewandelt. Die TIM wird durch hohe Konzentrationen von Acetyl-CoA, das bei der diabetischen Stoffwechsellage durch gesteigerte Lipolyse entsteht, gehemmt (HARTMANN et al. 1975).

Der Pyruvatgehalt ist 24 Stunden nach Toxingabe signifikant angestiegen (Abb. 10). Ursache hierfür ist die diabetische Stoffwechsellage. Beim Diabetes mellitus ist die PDH-Aktivität der Muskelzelle deutlich geringer. Langkettige Fettsäuren begünstigen den Übergang von (aktiver) $PDH_a$ in die (inaktive) $PDH_b$ (HENNIG et al. 1975). Durch die gesteigerte Lipolyse bei der diabetischen Stoffwechsellage kommt es zu einem Anstieg von Acetyl-CoA, $NADH_2$, freien Fettsäuren und Ketonkörpern, welche die PDH hemmen (COOPER et al. 1975).

Acetyl-CoA aktiviert die Pyruvatcarboxylase, sodaß Pyruvat beschleunigt zu Oxalacetat carboxyliert wird und mit Acetyl-CoA Citrat bildet.

Dieses vermag die Mitochondrienmembran zu passieren und hemmt im Cytoplasma die PFK. Citrat wird im Cytoplasma durch das "citrate cleavage enzyme" gespalten in Oxalacetat und Acetyl-CoA. Ersteres wird dann mittels $NADH_2$-abhängiger Malatdehydrogenase zu Malat reduziert und darauf durch das "malic enzyme" in $CO_2$, $NADPH_2$ und Pyruvat zerlegt. Pyruvat vermag die Mitochondrienmembran zu passieren und weitere Moleküle Acetyl-CoA nach Carboxylierung zu Oxalacetat aus den Mitochondrien herausschleusen (SCHULZE und KAFFARNIK 1970).

Der Pyruvatanstieg ist also Ausdruck für den vermehrt stattfindenden Fettabbau.

Eine andere Erklärung für den Pyruvatanstieg wäre ein Block im Zitronensäurezyklus. Unter dem Einfluß von CoenzymA-Thioester, die als Intermediärprodukte bei der $\beta$-Oxidation entstehen, kommt es zu einer Verringerung der Affinität der Citrat-Synthetase gegenüber Oxalacetat. Die Aktivität der Citrat-Synthetase ist damit reduziert. Der Glucose- und der Fettsäurenabbau wären also beide durch die geringe Aktivität der Citrat-Synthetase behindert (WIELAND und WEISS 1963).

Hier soll noch erwähnt werden, daß es auch nach Verbrennungen zu Blocks im Zitronensäurezyklus kommt: Dabei wurde beobachtet, daß die Aktivität der Citrat-Synthetase herabgesetzt war (CUTHBERTSON 1970, THRELLFALL 1970). Bei verbrannten Tieren findet THRELLFALL (1970) eine Zunahme von Acetyl-CoA und Oxalacetat in der Zelle, jedoch eine Abnahme von Citrat.
Weiterhin ist bei Verbrennungen die Umwandlung von $\alpha$-Ketoglutarsäure in Bernsteinsäure behindert; hierbei soll die $\alpha$-Ketoglutarsäure-Dehydrogenase gehemmt sein (DOLECEK und MAHAFFEY 1970, DOLECEK et al. 1971).

Der Abfall des intrazellulären Lactatgehalts und der Pyruvatanstieg 24 Stunden nach Toxingabe (Abb. 9 und 10) führen zu einem signifikant erniedrigtem Lactat/Pyruvat-Quotienten. Ursache für die Abnahme ist nicht nur eine bessere Sauerstoffversorgung der Muskulatur, sondern der Abfall ist hauptsächlich Ausdruck der diabetischen Stoffwechsellage.

Der weitgehend normalisierte intrazelluläre ATP-Gehalt zeigt ebenfalls, daß die Muskulatur inzwischen wieder besser mit Sauerstoff versorgt wird.

24 Stunden nach Toxingabe findet man also bei den Versuchstieren einen gesteigerten Metabolismus, wie er auch regelmäßig nach verschiedenen Traumen (Verbrennungen, Anaesthesie, Operationen) beobachtet wird. Verschiedene Hormone (Katecholamine, Glucocorticoide, Glukagon) stimulieren die Lipolyse, den Proteinkatabolismus und die Gluconeogenese und steigern damit die Blutglucosekonzentration. Dadurch entsteht ein "Pseudodiabetes" oder "Streßdiabetes" (DOLECEK et al. 1969). Das vermehrte Angebot energiereicher Substrate benötigt der Organismus, um Zellschäden zu beheben, die durch das Trauma entstanden sind. SCHOENENBERGER und Mitarbeiter (1976) konnten zeigen, daß Verbrennungstoxine in der Leber eine Mitochondrienmembranschädigung verursachen. Der bei MEYER (1977) und in dieser Arbeit beobachtete Hypermetabolismus stellt vermutlich die Reaktion des Organismus auf die Membranschädigung durch Verbrennungstoxine dar.

24 Stunden nach Injektion des Nativ-Proteins ergaben sich nur geringe Veränderungen der Metabolite im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Der normalisierte ATP-Gehalt zeigt an, daß der Sauerstoffmangel im Muskel

weitgehend behoben ist. Andere wichtige Parameter wie F-1.6-P, Pyruvat und Lactat unterscheiden sich nicht von den Metaboliten der Kontrollgruppe. Jedoch ist der intrazelluläre Glucosegehalt signifikant abgefallen. Einerseits liegt sicher ein Insulinmangel vor, da die Glucosekonzentration in der Leber im Normbereich liegt (MEYER 1977). Andererseits haben Katecholamine vermutlich die Glykogenolyse und Glykolyse stimuliert und, da dem Muskel genügend Sauerstoff angeboten wird, wurden erneut energiereiche Phosphate aufgebaut, deren Gehalt nach 4 Stunden reduziert war. Ob der Msukelstoffwechsel bei dem geringen Glucosegehalt in den folgenden Stunden durch Energiemangel bedroht ist, kann man aus diesen Ergebnissen nicht zwingend schließen. Dies muß in weiteren Arbeiten geklärt werden.

## E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde Kaninchen ein Apoprotein aus verbrannter (Toxin) und unverbrannter (Nativ) Mäusehaut intravenös injiziert.

Bei einem Teil der Tiere wurden 4 Stunden, bei einem anderen Teil 24 Stunden, nach Injektion zwei Muskelstücke entnommen. Gleichzeitig wurde mit derselben Methode ein Teil der Leber eingefroren (MEYER 1977).

In dieser Arbeit sollten Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel des Muskels untersucht werden. Es wurden deshalb folgende Metabolite bestimmt: Glucose, Fructose-1.6-diphosphat, Dihydroxyacetonphosphat, Pyruvat, Lactat, Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat und Adenosinmonophosphat.

Die Metabolitveränderungen 4 Stunden nach Toxingabe sprechen für eine relative Minderdurchblutung der Muskulatur, einen Schock. Dabei fällt der intrazelluläre Gehalt an Glucose und ATP ab, die Fructose-1.6-diphosphat-, Pyruvat- und Lactat-Konzentrationen steigen als Zeichen einer gesteigerten Glykolyse.

Nach Injektion des Nativproteins wurden tendenziell dieselben Stoffwechselveränderungen beobachtet.

24 Stunden nach Toxingabe besteht ein gesteigerter Metabolismus, ein "Pseudodiabetes" oder "Streßdiabetes". MEYER (1977) fand einen deutlichen Anstieg der Glucosekonzentration in der Leber. Daraus kann man schließen, daß auch die Blutglucosekonzentration stark angestiegen ist. Im Muskel findet man ebenfalls eine Zunahme des intrazellulären Glucosegehalts. Die erhöhten Konzentrationen von DAP und Pyruvat lassen sich leicht mit einer gesteigerten Lipolyse bei einer diabetischen Stoffwechsellage in Einklang bringen. Als Zeichen der

normalisierten Sauerstoffversorgung liegen Lactat- und ATP-Konzentrationen im Normbereich. Als Ausdruck der diabetischen Stoffwechsellage ist der Lactat/Pyruvat-Quotient abgefallen.
Der gesteigerte Metabolismus stellt vermutlich die Reaktion des Organismus auf eine Zellmembranschädigung durch Verbrennungstoxine (SCHOENENBERGER et al. 1976) dar.

24 Stunden nach Injektion des Nativproteins hat sich der ATP-Gehalt des Muskels ebenfalls normalisiert. Jeoch ist die Glucosekonzentration weiter abgefallen. Ob der Muskelstoffwechsel deshalb in den folgenden Stunden durch Energiemangel bedroht ist, läßt sich an Hand dieser Ergebnisse nicht entscheiden.

F. Abkürzungen

ABTS = 2'2 Azino-di-[3-äthyl-benzthiazolin-sulfonsäure-(6)]-diammoniumsalz
ADP = Adenosindiphosphat
AMP = Adenosinmonophosphat
ATP = Adenosintriphosphat
DAP = Dihydroxyaceton-phosphat
FG = Frischgewicht
GAP = D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAPDH = Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
G-6-P = Glucose-6-phosphat
GDH = Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase
GOD = Glucose-Oxydase
KG = Körpergewicht
LDH = Lactat-Dehydrogenase
MK = Myokinase (Adenylat-Kinase)
$NADH_2$ = $NADH+H^+$ = red. Nicotinamid-adenin-dinucleotid
Nativ = Apoprotein aus unverbrannter Haut
PGK = 3-Phosphoglycerat-Kinase
PK = Pyruvat-Kinase
POD = Peroxydase
TIM = Triosephosphat-Isomerase
Toxin = Apoprotein aus verbrannter Haut.

G. Literaturverzeichnis

1. Adam, H.: in H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 2. Aufl., Bd. II, 2051 (1970).
2. Aikawa, N., J.B. Caulfield, R.J.S. Thomas, J.F. Burke: Postburn hypermetabolism: Relation to evaporative heat loss and catecholamine level Surg. Forum 26, 74-76 (1975).
3. Alexander, J.W., M.W. Fisher, B.G. MacMillan: Immunological control of pseudomonas infection in burn patients. A clinical evaluation. Arch. Surg. 102, 31-35 (1975).
4. Arturson, G.: Pathophysiological aspects of the burn syndrom, with special reference to liver injury and alterations of capillary permeability. Acta Chir. Scand. Suppl. 274, 135 (1961).
5. Aspin, A.A.: Tables for use in comparison whose accuracy involves two variances, seperatly estimated. Biometrika 36, 290-293 (1949).
6. Aynsley-Green, A., J.F. Biebuyck, K.G.M.M. Alberti: Anaesthesia and Insulin secretion: the effects of diethylether, halothane, pentobarbitone sodium and ketamine hydrochlorid on intravenous glucose tolerance and insulin secretion in rat. Diabetologia 9, 274-281 (1973).
7. Bailey, C.J., T.W. Atkins, A.J. Matty: Some preliminary observations concerning carbohydrate metabolism during prelonged pentobarbitone anaesthesia. J. Endocrinology 64(3), 60P-61P (1975).

8. Batstone, G.F., L. Hinks, R. Whitefoot, S. Bloom, J.E. Laing, K.G.M.M. Alberti: Hormonal changes after thermal injury.
J. Endocrinology 68(3), 38P-39P (1976).

9. Baxter, C.R.: The current status of burn research.
J. Trauma 14, 1-8 (1974).

10. Baxter, C.R., W.A. Cook, G.T. Shires: Serum myocardial depressant factor of burn shock.
Surg. Forum 17, 1 (1966)

11. Baxter, C.R., J.A. Moncrief, M.D. Prager, L.S. Cohen: A circulating myocardial factor in burn shock. in: P. Matter, T.L. Barclay, Z. Koničková: Research in burns; Bern, Stuttgart, Vienna: Huber 1971, 499-502.

12. Birke, G., L.A. Carlson, S.-O. Liljedahl: Lipid metabolism and trauma: III. Plasma lipids and lipoproteins in burns.
Acta Med. Scand. 178, 337-350 (1965).

13. Birke, G., H. Dunner, S.-O. Liljedahl, B. Pernow, L.O. Plantin, L. Troell: Histamine, catecholamines, and adrenocortical steroids in burns.
Acta Chir. Scand. 114, 87-98 (1957).

14. Burri, C., M. Allgöwer:
    a. Die Herstellung steriler Gewebshomogenate und ihre Prüfung im Tierversuch.
    Z. ges. exp. Med. 138, 92-98 (1964).
    b. Die toxische Wirkung steriler, verbrannter Haut bei Mäusen verschiedener Stämme.
    Schweiz. med. Wschr. 16, 560-563 (1964).
    c. Die Wirkung verbrannter, steriler Haut auf normale und RES-blockierte Mäuse
    Z. ges. exp. Med. 138, 378-384 (1964).

15. Bücher, T.: Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment.
Biochim. biophys. Acta 1, 292-314 (1947).

16. Cavalli-Sforza, L.: Biometrie. Grundzüge biol.-med. Statistik. 3. Auflage, Fischer Stuttgart 1972.

17. Cahill, G.F. Jr., J. Ashmore, A.S. Earle, S. Zottu: Glucose penetration into liver.
Amer. J. Physiol. 192, 491-496 (1958).

18. Cohen, R.D., R. Simpson: Lactat metabolism.
Anaesthesiol. 43(6), 661-673 (1975).

19. Cooper, R.H., P.J. Randle, R.M. Denton: Stimulation of phosphorylation and inactivation of pyruvate dehydrogenase by physiological inhibitor of the PDH reaction.
Nature 257, 808-809 (1975).

20. Cueni, L.B., M. Allgöwer, G.A. Schoenenberger: Isolierung und physikalisch-chemische Charakterisierung eines Verbrennungstoxins aus der Mäusehaut.
Res. exp. Med. 156, 110-128 (1971).

21. Cuthbertson, D.P.: Modern review on the disturbed metabolism consequent on thermal burning.
J. roy. Coll. Surg. Edinb. 15, 239-249 (1970).

22. Czok, R., W. Lamprecht: in H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl., Bd. II, Verlag Chemie Weinheim 1974, 1491.

23. Davidson, M.B.: Studies on the mechanism of pentobarbital-induced glucose intolerance.
Hormon. Metabol. Res. 3, 243-247 (1971).

24. Denton, R.M., P.J. Randle: Citrate and the regulation of adipose tissue phosphofructokinase.
Biochem. J. 100, 420-423 (1966).

25. Doleček, R., W. Mahaffey: The uncoupling phenomenon and metabolic blocks after burns. Acta Chir. plast. (Praha) 12, 217-222 (1970).

26. Doleček, R., M. Buse, D. Kuperminc: Insulin and HGH levels in plasma of burned patients. Čas. Lék. Česk. 108, 1520 (1969).

27. Doleček, R., D. Burýskova, M. Buse, Z. Koničková, D. Kuperminc, W. Mahaffey, M. Zavada: Metabolic and morphologic response after burns: impairment of energy metabolism and therapeutic possibilities in P. Matter, T.L. Barclay, Z. Koničkova: Research in burns. Bern, Stuttgart, Vienna: Huber 1971, 535-541.

28. Domres, B.: Habilitationsschrift (in Vorbereitung) Tübingen.

29. Droste, O.: Inaugural-Dissertation, Tübingen (in Vorbereitung).

30. Fedorov, N.A., B.E. Movshev, R.W. Nedoschiwina, W.N. Petrow, W.I. Awertschenko: Isolierung und Untersuchung toxischer Fraktionen verbrannter Haut. Vopr. med. chim. 20, H 4, 371-375 (1974).

31. Feller, J., C. Pierson: Pseudomonas vaccine and hyperimmunplasma for burned patients. Arch. Surg. 97, 225-234 (1968).

32. Feller, J., C. Pierson: A reduction of pseudomonas septicaemia in burned patients by the immune process. Surg. Clin. N. Amer. 50, 1377-1383 (1970).

33. Furner, R.L., E.D. Neville, K.S. Talarico, D.D. Feller: Effects of pentobarbital on plasma glucose and free fatty acids in rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 231-234 (1972).

34. Gilmore, J.P., H.A. Fozzard: Liver function following thermal injury.
Amer. J. Physiol. 198, 491 (1960).

35. Goodall, Mc C., B.W. Haynes Jr.: Adrenal medullary insufficiency in severe thermal burn.
J. Clin. Invest. 39, 1927 (1960).

36. Goodall Mc C., J.A. Moncrief: Sympathic nerve depletion in severe thermal injury.
Ann. Surg. 162, 893 (1965).

37. Goodall Mc C., H. Alton: Dopamin replacement and metabolism in sympathic nerve and adrenal medullary depletions after prelonged thermal injury.
J. Clin. Invest. 48, 1761 (1969).

38. Goodall Mc C., C. Stone, M. Turunen: Urinary output of adrenalin and noradrenalin in severe thermal burns.
Ann. Surg. 145, 479 (1957).

39. Gutmann, I., A.W. Wahlefeld: in H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl., Bd. II, Weinheim, Verlag Chemie 1974, 1510.

40. Hagg, S.A., S.I. Taylor, N.B. Ruderman: Glucose metabolism in perfused skeletal muscle: PDH activity in starvation, diabetes and exercise.
Biochem. J. 158, 203-210 (1976).

41. Hakim, A.A.: Thermal injury: Release of a cytotoxic factor.
Experientia 29, 865-867 (1973).

42. Harrison, H.N., J.A. Moncrief, J.W. Duckett, A.D. Mason: The relationship between energy metabolism and water loss from vaporization in severely burned patients.
Surgery 56, 203-211 (1964).

43. Hartmann, F.C., I.L. Norton: Triosephosphate-Isomerase from rabbit muscle.
Methodes in Enzymol. XLI, Part B, 1975, 447-453.

44. Hennig, G., G. Löffler, O.H. Wieland: Active and inactive forms of pyruvatedehydrogenase in skeletal muscle as related to the metabolic and functional state of the muscle cell.
FEBS letters 59, 142-145 (1975).

45. Hers, H.G., H. de Wulf, W. Stalmans, G. van den Berghe: The controll of glykogen synthesis in the liver.
Adv. Enzym. Reg. 8, 171-190 (1970).

46. Hessman. Y.: Glykogen storage in thermal trauma.
Doctoral thesis at Uppsala University 1974.

47. Hessman, Y.: Glykogen storage in rat liver and skeletal muscle in thermal trauma.
Acta Chir. Scand. 141, 473-479 (1975).

48. Himms-Hagen, J.: Sympathetic regulation of metabolism.
Pharmacol. Rev. 19, 367-461 (1967).

49. Hinton, P.: Biochemical changes in burned patients.
Postgrad. med. J. 48, 144-147 (1972).

50. Hinton, P., S.P. Allison, S. Littlejohn, J. Lloyd: Insulin and glucose to reduce catabolic response to injury in burned patients.
Lancet 1971 I, 767-769.

51. Hohorst, H.J., F.H. Kreutz, T. Bücher: Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen in der Leber der Ratte.
Biochem. Z. 332, 18-46 (1950).

52. James, W.P.T., D.J. Millward, P.J. Garlic: Insulin and glucose to reduce catabolic response to burns.
Lancet 1971 II, 1078.

53. Jäättelä, A.: Effect of traumatic shock of plasma catecholamine levels.
Ann. Clin. Res. 4, 204 (1972).

54. Jones, R.J., E.J. Lowbury: Antiserum and antibiotic in the prophylaxis against Pseudomonas aeruginosa.
in A.B. Wallace, A.W. Wilkinson: Research in burns, Edinburg: Livingstone 1966, 474-485.

55. Kernahan, D.A.: Recent and current trends in burn research and treatment.
Canad. med. Ass. J. 97, 433-439 (1967).

56. Koslowski, L.: Autolyse-Krankheiten in der Chirurgie, Stuttgart: Thieme 1959.

57. Koslowski, L.: Der Wandel der Infektion als Krankheitsfaktor und Todesursache nach Verbrennungen.
Langenbecks Arch. Klin. Chir. 304, 672-675 (1963).

58. Koslowski, L.: Zur Pathophysiologie und Allgemeinbehandlung schwerer Verbrennungen - neuere Einsichten und Erfahrungen.
Chirurg 41, 385-390 (1970).

59. Malaisse, W.J., F. Malaisse-Lagae: A possible role for the adenylcyclase system in insulin secretion.
J. Clin. Invest. 46, 1724-1734 (1967).

60. Marquez-Julio, A., I.W. French: The effect of ether, pentobarbital and decapitation on various metabolites of rat skeletal muscle.
Canad. J. Biochem. 45, 1323-1327 (1967).

61. Maskos, E.: Inaugural-Dissertation, Tübingen (in Vorbereitung).

62. Meyer, M.: Inaugural-Dissertation, Tübingen (in Vorbereitung).

63. Michal, G., H.-O. Beuttler: in H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl., Weinheim: Verlag Chemie 1974, 1359.

64. Migone, L.: Metabolic aspects of shock. in K.D. Bock (ed.): Shock: Pathogenesis and therapy, Berlin: Springer 1962.

65. Morgan, H.E., P.J. Randle, D.M. Regen: Regulation of glucose uptake by muscle. 3. The effects of insulin, anoxia, salicylate and 2:4-dinitrophenol on membrane transport and intrazellular phosphorylation of glucose in the isolated rat heart.
Biochem. J. 73, 573-579 (1959).

66. Morgan, H.E., E. Canedas, D.M. Regen, C.R. Park: Regulation of glucose uptake in muscle: II. Rate-limiting steps and effects of insulin and anoxia in heart muscle from diabetic rat.
J. biol. Chem. 236, 262-268 (1961 A).

67. Morgan, H.E., D.M. Regen, M.J. Henderson, T.K. Sawyer, C.R. Park: Regulation of glucose uptake in muscle. IV. Effects of hypophysectomy, adrenalectomy, growth hormone, hydrocortisone and insulin on glucose transport and phosphorylation in the perfused rat heart.
J. biol. Chem. 236, 2162-2168 (1961 B).

68. Movshev, B.E.: Fraktionierung von Eiweißstoffen aus normaler und verbrannter Haut mittels Gelfiltration.
Patol. Fiziol. Eksp. Ter. 145, 37-41 (1971).

69. Moyer, C.A., H.R. Butcher: Assessment of the therapy of burns. in: Burns, shock and plasma volume regulation. St. Louis: Mosby 1967, 355-364.

70. Newsholme, E.A., P.J. Randle: Regulation of glucose uptake by muscle. Effects of fatty acids, ketonbodies, pyruvate, and of alloxan diabetes, starvation, hypophysectomy and adrenalectomy, on the concentrations of hexose phosphates, nucleotides and inorganic phosphate in the perfused rat heart. Biochem. J. 93, 641-651 (1964).

71. Passoneau, J.V., O.H. Lowry: Phosphofructokinase and pasteur effect. Biochem. biophys. Res. Commun. 7, 10-15 (1962).

72. Pessacq, M.T., O.R. Rebolledo, J.J. Gagliardino: Day-time dependence of the serum free fatty acids, glucose and immunoreactive insulin levels. Acta Physiol. lat.-amer. 22, 187-189 (1972).

73. Philips, A.W.: Burn therapy. V. Disaster management - to treat or not to treat. Ann. Surg. 168, 986-996 (1968).

74. Philips, A.W., O. Cope: An analysis of the effect of burn therapy on burn mortality. in: Research in burns. (ed.) C.P. Artz, Philapelphia 1962, 1-5.

75. Ramaiah, A.: Regulation of glykolysis in skeletal muscle. Life Sci. 19, 455-466 (1976).

76. Randle, P.J., G. Smith: Regulation of glucose uptake by muscle. 2. The effects of insulin, anaerobiosis and cell poisons on the penetration of isolated rat diaphragm by sugars. Biochem. J. 70, 501-508 (1958).

77. Rao, L.N., H.V. Bhatt: Stress response during surgery and anaesthesia indicated by norepinephrine concentration in plasma of surgical patients.
Int. Surg. 57, 294 (1972).

78. Regen, D.M., W.W. Davis, H.E. Morgan: Regulation of hexokinase activity in muscle; effects of diabetes and anoxia on hexose phosphat levels.
Fed. Proc. 20, 83 (1961).

79. Regen, D.M., W.W. Davis, H.E. Morgan, C.R. Park: The regulation of hexokinase and phosphofructokinase activity in heart muscle.
J. biol. Chem. 239, 43-49 (1964).

80. Renauld, A., R.C. Sverdlik: Pentobarbital anaesthesia: Effects on blood sugar, serum immunoreactive insulin and free fatty acid responses to glucose.
Experientia 31(4), 474-475 (1975).

81. Roe, C.F., J.M. Kinney, C.Blair: Water and heat exchange in third-degree burns.
Surgery 56 212-220 (1964).

82. Rosenthal, S.R., P.L. Hawley, A.A. Hakim: Purified burn toxic factor and its competitin.
Surgery 71(4), 527-536 (1972).

83. Rosenthal, S.R., G.T. Crouse, W.A. Spurrier, K.C. Thadhani: Human "burn toxin" and in-vitro-produced "antitoxin".
Ann. N. Y. Acad. Sci. 1968, 792-806.

84. Sachs, A.: Active immunoprophylaxis in burns with a new multivalent vaccine.
Lancet 1970 II, 959-961.

85. Schmidt, K.:
a. Habilitationsschrift, Tübingen 1977.
b. mündliche Mitteilung.

86. Schoenenberger, G.A.: Burn toxin isolated from mouse and human skin.
Monogr. Allergy 9, 72-139. Basel: Karger 1975.

87. Schoenenberger, G.A., M. Allgöwer, B. Kremer, K. Städtler: Neue Gesichtspunkte zur Verbrennungskrankheit.
Chirurg 47,582-588 (1976).

88. Schoenenberger, G.A., L.B. Cueni, U. Bauer, U. Eppenberger, M. Allgöwer: Isolation and characterization of a toxic lipoprotein complex formed in mouse skin by controlled thermal energy.
Biochim. biophys. Acta 263, 149-163 (1972).

89. Schoenenberger, G.A., M. Allgöwer, F. Burkhardt, W. Müller, K. Städtler: Pathogenetische Bedeutung eines spezifischen cutanen Verbrennungstoxins für Infektion und Spätmortalität nach schweren Verbrennungen.
Zentralblatt Chir. 99, 1089-1097 (1974).

90. Scholz, R., F. Schwarz, T. Bücher: Barbiturate und energieliefernder Stoffwechsel in der hämoglobinfrei durchströmten Leber der Ratte.
Z. klin. Chem. 4, 179-188 (1966).

91. Schulze, B., H. Kaffarnik: Biochemische Grundlagen der gestörten Wechselbeziehung zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel bei Diabetes mellitus.
Klin. Wschr. 48, 1147-1157 (1970).

92. Schumer, W., J.C. Kukral: Metabolism of shock.
Surgery 63, 630-636 (1968).

93. Sevitt, S.: Toxaemia in burns.
Mod. Trends plast. Surg. 2, 126-149 (1966).

94. Sharma, C.R., R. Manjeshwar, S. Weinhouse: Hormonal and dietary regulation of hepatic gluockinase.
Adv. Enz. Reg. 2, 189-200 (1964).

95. Shoemaker, W.C., W.F. Walker, L.N. Turk: The role of the liver in the development of hemorrhagic shock.
Surg. Gynec. Obstet. 112, 327-333 (1961).

96. Städtler, K., M. Allgöwer, L.B. Cueni, G.A. Schoenenberger: Immuntherapeutische Untersuchungen mit Verbrennungstoxin am Modell der Maus.
Res. exp. Med. 158, 34-42 (1972).

97. Storey, K.B., P.W. Hochachka: Activation of muscle glycolysis: A role for creatinphosphate in phosphofructokinase regulation.
FEBS letters 46(1), 337-339 (1974).

98. Threllfall, C.J.: Intermediary carbohydrate metabolism in injured rat liver in relation to heat production. in: R. Porter and J. Knight (eds.) Energy metabolism in trauma. London 1970.

99. Tubbs, P.K.: Inhibition of citrate formation by long-chain acyl thioesters of coenzyme A as a possible control mechanism in fatty acid biosynthesis.
Biochim. biophys. Acta 70, 608-609 (1963).

100. Van de Loo, H.-M.: Über den Metabolitgehalt von Glucose, F-1.6-$P_2$, DAP, GAP, Pyruvat, Lactat und ATP im Muskel, in der Leber, in den Nieren und im Herz der Ratte in der Schockphase nach experimenteller Verbrennung bei 250°C.
Inaugural-Dissertation, Tübingen 1976.

101. Watts, D.T., V. Westfall: Studies on peripheral blood catecholamine levels during hemorrhagic shock in dog.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 6o1 (1964).

102. Welch, A.D.: Interference with biological processes through the use of analogues of essential metabolites.
Physiol. Rev. 25, 687-719 (1945).

103. Werner, W., H.-G. Rey, H. Wielinger: Über die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode.
Z. analyt. Chem. 252, 224-228 (1970).

104. Wieland, O., L. Weiss: Inhibition of citrate synthase by palmityl-coenzyme A.
Biochem. biophys. Res. Commun. 13, 26-31 (1963).

105. Wieland, W., L. Weiss, I. Eger-Neufeldt, A. Teinzer, B. Westermann: Coenzym A-Thioester höherer Fettsäuren als mögliche Vermittler enzymatischer Regulationen im Tierkörper.
Klin. Wschr. 43, 645-654 (1965).

106. Wilmore, D.W., J.M. Long, A.D. Mason, R.W. Skreen, B.A. Pruitt: Catecholamines: Mediator of the hypermetabolic response to thermal injury.
Ann. Surg. 180(4), 653-669 (1974).

107. Wilmore, D.W., J.A. Moyland, C.A. Lindsey, F.R. Faloona, R.H. Unger, B.A. Pruitt: Hyperglucagonaemia following thermal injury: insulin and glucagon in the posttraumatic catabolic state.
Surg. Forum 24, 99-101 (1973).

108. Wollenberger, A., O. Ritau, G. Schoffa: Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebsstücke
Pflügers Arch. ges. Physiol. 270, 399-412 (1960).

109. Zawacki, B.E., W. Spitzer, A.D. Mason, L.A. Johns: Does increased evaporative water loss cause hypermetabolism in burned patients? Ann. Surg. 171, 236-240 (1970).

Frl. Hauck, Frl. Jobbagi und Frau Wundt danke ich für die technische Assistenz bei der Durchführung der Analysen, Frl. Steinbauer für die Isolierung und Aufarbeitung der toxischen Substanzen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. K. Schmidt: Für die Überlassung des Themas, für die jederzeit hilfreiche Betreuung und die zahlreichen Anregungen zur Durchführung der Experimente und zur Abfassung der Arbeit.

## Lebenslauf

Franz Bihr

| | |
|---|---|
| 8. Mai 1953 | geboren in Aalen-Rodamsdörfle als Sohn des Landwirts Johann Bihr und seiner Ehefrau Marth, geb. Holl |
| 1960-1964 | Besuch der Grundschule in Aalen-Dewangen |
| April 1964 | Übertritt in das Deutschorden-Gymnasium in Bad Mergentheim |
| Aug. 1968 | Wechsel an das Peutinger-Gymnasium in Ellwangen/Jagst |
| 12. 6. 1972 | Reifeprüfung am Peutinger-Gymnasium |
| Aug. 1972 | Hilfspfleger am Kreiskrankenhaus in Ellwangen/Jagst |
| 3.April 1973 | Beginn des Medizinstudiums an der Universität Tübingen |
| 25. 8. 1975 | Ärztliche Vorprüfung |
| 31. 8. 1976 | 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 15. 3. 1979 | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 23. 4. 1979 | Beginn des praktischen Jahres am Paracelsuskrankenhaus in Ruit Wahlfach: Gynäkologie |
| | 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 10. 4. 1980 | schriftlicher Teil in Reutlingen |
| 23. 4. 1980 | mündlicher Teil in Ruit |